

ACTA

PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

3.

2014

APHGAO 84, (043) 89–120. (2014)



A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

Főszerkesztő:

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet
1092 Budapest, Högyes E. u. 9.
Tel.: 217-0891;
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

Felelős szerkesztő:

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,
1092 Budapest, Högyes E. u. 7–9.
Tel.: 217-0927;
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

A szerkesztőbizottság tagjai:

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,
Tóthfalusi László

A szerkesztőség címe – Correspondence:

Acta Pharmaceutica Hungarica
1092 Budapest, Högyes Endre u. 9.

A főszerkesztő munkatársa:

Hankó Zoltán MGYT,
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

TARTALOM

<i>Kékesi László, Sipos Anna, Németh Gábor, Dancsó András, Illyés Eszter, Boros Sándor, Breza Nóra, Nemes Zoltán, Hegymegi-Barakonyi Bálint, Pató János, Greff Zoltán, Kéri György, Őrfi László: Erlotinib-érzékeny és erlotinib-rezisztens sejtvonalakat gátló pirido[2,3-b]pirazinok, és előállításuk régiószelektív kondenzációs reakcióval.</i>	91
<i>Silló Szabolcs, Varga Erzsébet, Belák Ágnes, Maráz Anna.: Az Epilobium angustifolium L. (erdei deréce) fitokémiai és antimikrobás hatásának vizsgálata.</i>	105
<i>Hódi Ágnes, Földesi Imre, Hajagos-Tóth Judit, Ducza Eszter, Gáspár Róbert: R(+)-limonén hatása a β-adrenerg jelátvitelre a simaizomzatban: az oxidatív stressz index jelentősége.</i>	111

CONTENTS

Kékesi L., Sipos A., Németh G., Dancsó A., Illyés E., Boros S., Breza N., Nemes Z., Hegymegi-Barakonyi B., Pató J., Greff Z., Kéri Gy., Órfi L.: Pyrido[2,3-b]pyrazines inhibiting both erlotinib-sensitive and erlotinib-resistant cell lines, and their preparation via regioselective condensation reaction	91
Silló Sz., Varga E., Belák Á., Maráz A.: <i>Phytochemical and antimicrobial investigation of Epilobium angustifolium</i> L.. . . .	105
Hódi, A., Földesi, I., Hajagos-Tóth, J., Ducza, E., Gáspár, R.: The effect of R(+) limonene on β - adrenergic signaling: the significance of oxidative stress index.	111

Erlotinib-érzékeny és erlotinib-rezisztens sejtvonalakat gátló pirido[2,3-b]pirazinok, és előállításuk régiószelektív kondenzációs reakcióval

KÉKESI LÁSZLÓ^{A,D}, SIPOS ANNA^D, NÉMETH GÁBOR^D, DANCÓS ANDRÁS^E, ILLYÉS ESZTER^D, BOROS SÁNDOR^D, BREZA NÓRA^D, NEMES ZOLTÁN^D, HEGYMEGI-BARAKONYI BÁLINT^{A,D}, PATÓ JÁNOS^D, GREFF ZOLTÁN^D, KÉRI GYÖRGY^{A,B,D,*}, ÓRFI LÁSZLÓ^{A,C,D}

^ARacionális Hatóanyagtervező Laboratóriumok, Kooperációs Kutatóközpont, Semmelweis Egyetem

^BMTA-SE Pathobiokémia Kutatócsoport, Orvosi Vegytani Intézet, Semmelweis Egyetem

^CGyógyszerészi Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

^DVichem Chemie Kutató Kft.,

^EEgis Gyógyszergyár Zrt., 1475 Budapest 10, Pf. 100., 1106 Budapest, Keresztúri út 30-38.

* Levelező szerző

E-mail: keri@vichem.hu

Cím: Vichem Chemie Research Kft.

1022 Budapest, Herman Ottó 15.

Telefonszám: +36-1-487-2080

Summary

Kékesi L., Sipos A., Németh G., Dancs A., Ilyés E., Boros S., Breza N., Nemes Z., Hegymegi-Barakonyi B., Pató J., Greff Z., Kéri Gy., Órfi L.: **Pyrido[2,3-b]pyrazines inhibiting both erlotinib-sensitive and erlotinib-resistant cell lines, and their preparation via regioselective condensation reaction**

The EGFR inhibitor erlotinib possesses high anti-tumor effect but despite the good clinical responses in most of the cases recurrence occurs. This can be attributed to a secondary, acquired mutation causing resistance to tyrosine kinase inhibitors. In our work we were looking for small-molecule inhibitors, which simultaneously affect on the proliferation of erlotinib-sensitive PC9 cells and PC9-ER erlotinib-resistant cells.

A set of molecules were selected from Vichem Chemie Research Ltd.'s kinase inhibitor compound library (Nested Chemical LibraryTM). According to the results of medium throughput screening (MTS) of this set of compounds, novel structures with pyrido[2,3-b]pyrazine core were designed. These compounds were proved to be effective inhibitors of resistant cells in phenotypic screening. Based on these results structure-activity relationships were set up.

The pyrido[2,3-b]pyrazine core was synthesized by a condensation reaction, which resulting two asymmetric products. In the reaction two regioisomer intermediates formed, and one of the products is the intermediate of the effective compounds. This condensation reaction was optimized, the regioisomers were identified by NMR analysis and X-ray crystallography. As a result of optimization we found that lower reaction temperature and replacement of dimethylformamide solvent with trifluoroacetic acid provided the undesired isomer in less than 2 % ratio.

Keywords: erlotinib resistance, phenotypic screen, PC9, regioselectivity, thermal effect, acidic catalysis, X-ray crystal structure

Összefoglalás

Az EGFR gátló erlotinib jelentős tumor ellenes hatással rendelkezik, ám a kiemelkedő terápiás válasz ellenére a legtöbb esetben a tumor kiújul. Ennek hátterében egy másodlagos, szerzett mutáció állhat, ami rezisztenciát okoz a tirozin kináz inhibitorokra. Munkánk során olyan kismolekulás gátlószereket kerestünk, melyek egyszerre hatnak a PC9 erlotinib-érzékeny sejtek, és a PC9-ER erlotinib rezisztens sejtek proliferációjára is. A Vichem Chemie Kft. kinázgátló vegyülettárából (Nested Chemical LibraryTM) válogatott vegyületcsoport MTS (medium throughput screening) szűréséből kikerülő eredmények alapján új szerkezetű, pirido[2,3-b]pirazin alapozú molekulákat terveztünk és szintetizáltunk. Az így kapott vegyületek fenotipikus tesztelés során hatékonyak bizonyultak a rezisztens sejtek gátlására. Az eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggést állítottunk fel.

A pirido[2,3-b]pirazin alapozat egy aszimmetrikus terméket eredményező kondenzációs reakcióban állítottunk elő. A reakcióban két régióizomer köztitermék keletkezik, melyek közül csak az egyik izomer az, melynek továbbépítésével a hatékony szerkezetekhez juthatunk. Ezt a kondenzációs reakciót ezért munkánk során optimalizáltuk, a régióizomereket NMR analízissel és röntgenkristallográfiával azonosítottuk. Az optimalizálás eredményeképpen azt kaptuk, hogy a reakció-hőmérsékletet csökkentve és az oldószert dimetilformamidról trifluoecetsavra cserélve, a reakció során a nem kívánt izomer aránya 2%-ra csökkent.

Kulcsszavak: erlotinib rezisztencia, fenotipikus screen, PC9, régiószelektivitás, hőmérséklet hatás, savas katalízis, röntgenkristallográfia

Bevezetés

Ha a sejten belüli jeltovábbítási hálózat valamelyik eleme hibásan működik, a keletkező hamis jel (túlélési faktor) módosíthatja a jeltovábbítási kaszkádot, ezzel patológiás működést, például kontrollálatlan sejtosztódást válthat ki. A legtöbb daganatos betegség hátterében jeltovábbítási problémák állnak. A rendellenesen működő enzimek ellen fejlesztett hatóanyagok célzott terápiát tesznek lehetővé [1].

A normál és gyorsan osztódó sejtek közti különbség kihasználható azokkal a szerekkel, melyek a túlélési faktorok jelátviteli útvonalait célozzák. Ilyen kis molekulájú tirozin kináz-gátlószer (TKI) az erlotinib. Az erlotinib az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) tirozin kináz gátlószere, mely gátolja az adenozin trifoszfát (ATP) kötődését a receptor ATP kötőhelyén [2]. Az EGFR tirozin-kináz inhibitorokat széles körűen alkalmazzák EGFR-függő (aktiváló mutációt tartalmazó) tumorokban, mint például a nem kissejtes tüdőrák (NSCLC) és a vastagbél rák, melyek jól is reagálnak ezekre a szerekre. Az erlotinib azonban nem hatékony azokon az NSCLC sejteken, melyek nem érzékenyítő mutáns, hanem vad típusú EGFR-t tartalmaznak [3]. Az irodalomból és a klinikai gyakorlatból egyaránt ismert probléma a hatékony erlotinib kezelés utáni visszaesés – a szerzett rezisztencia [4]. Több más mechanizmus mellett az esetek felében ez a rezisztencia az EGFR exon 20-on történő T790M mutációjával valósul meg. Az egyik, rezisztenciához kapcsolódóan gyakran vizsgált sejtvonal a humán NSCLC PC9 sejtvonal, amely exon 19 deléciós mutációt tartalmaz [5-7].

Munkánk során célul tűztük ki szabadalmaztatható vegyületek fejlesztését, amelyek daganatos betegségekben potenciálisan a rezisztens sejteket is gátolni tudják. Ahogy azt korábban publikáltuk, ismert kinázgátló referencia anyagok szerkezetéből új molekulákat terveztünk, és az így kapott pirido [2,3-*b*]pirazin alapszerkezetű vegyületek hatékonynak bizonyultak a rezisztens sejtek gátlására. Az eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggést állítottunk fel [8]. A szintézis során felmerült régió-izomériai kérdéseket tisztáztuk [9]. Jelen közleményben ezen eredményeket kívánjuk áttekinteni.

Anyagok és módszerek

Vegyületek és szintézis

A szintézisek során klasszikus oldat-, és folyadékfázisú szerves kémiai szintetikus eljárásokat al-

kalmaztuk, laboratóriumi üvegeszközökben. A szintézishez felhasznált vegyületek kiinduló anyagait a Sigma-Aldrich Kft, Merck Kft, Molar Chemicals Kft, Alfa Aesar GmbH&Co KG, Matrix Scientific, TCI Europe N.V. és Apollo Scientific Ltd cégektől szereztük be és további tisztítás nélkül használtuk fel őket a szintézisek során.

A biológiai tesztekben vizsgált végtermékek a Vichem Chemie Kft. (Budapest, Magyarország) kinázgátló vegyülettárának részét képezik (Nested Chemical Library™).

Analitikai módszerek

Az LCMS analízist Waters Alliance 2795 típusú fordított fázisú, Waters 996 DAD UV detektorral felszerelt nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal összekapcsolt Waters Acquity SQD tömegspektrométerrel végeztük. Waters XBridge C18 (50 mm x 4,6 mm, 3,5 µm) típusú kolonnát használtunk gradiens módban 2 ml/perc áramlás sebességgel.

Az izomériaarány vizsgálathoz használt bázikus eluens:

(A) oldószer: 5 mM NH₄HCO₃

(B) oldószer: 100% acetonitril

Futási idő: 13 perc

Gradiens:	t(min)	A%	B%
	0,00	95	5
	0,50	95	5
	10,00	35	65
	11,00	5	95
	12,00	5	95
	12,50	95	5
	13,00	95	5

Injektálás: 5 µg.

A ¹H-NMR analízist Bruker DRX-300 típusú készülékkel végeztük, 30 °C-on. Oldószernek, ha külön nem jelöltük, DMSO-*d*₆-t használtunk.

A régióizomerek ¹H- és ¹³C-NMR vizsgálatát Varian Inova 500 típusú készülékkel, ¹⁵N-NMR vizsgálatát pedig Bruker Avance-III 400 készülékkel végeztük. Oldószernek kloroform-*d*-t használtunk.

Lumineszcens sejt túlélés (viabilitás) vizsgálat

A biológiai mérésekhez a reagenseket a Sigma-Aldrich Kft, Invitrogen Co és a Gibco cégektől szereztük be. A sejtvitalitás vizsgálatához a NSCLC elváltozásokat modellező adherens PC9 és erlotinib-rezisztens variánsát, a PC9-ER sejtvonalat használtuk. A sejtvonalakat a Cancer Research

UK London Research Institute, Signal Transduction Laboratory bocsátotta rendelkezésünkre. A PC9-ER sejtvonal erlotinib rezisztenciájának kialakítását a Cancer Research UK London Research Institute, Signal Transduction Laboratory végezte és ellenőrizte. A sejteket RPMI-1640 médiumban tenyésztettük. A médium 10% FBS-t és 1% Ab/Amot tartalmazott. A sejteket felhasználásig 37 °C-on, 5%-os CO₂ termosztátban tartottuk.

A sejtenyészetekből egysejtszuspenziót készítettünk, és lyukanként (well) ezer sejtet pipettáztunk 384-es fehér mikrolemezekre (CulturPlate, PerkinElmer, Waltham, MA). Másnap a sejteket a megfelelő gátlószerekből készült hígítási sorral kezeltük (30 µM-tól induló, 10 pontos, harmadoló hígítási sor). A sejtek életképességét, valamint az EC₅₀ értékét 72 óra után a CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega Corp.) kit segítségével határoztuk meg a gyártó leírásának megfelelően. A vizsgálat az életképes sejtek számát határozza meg az ATP jelenlétének közvetett kimutatása révén. A reakció során a luciferáz enzim Mg²⁺ és ATP jelenlétében a luciferin mono-oxidációját katalizálja, melynek során oxiluciferin keletkezik. A kimutatás során az oxiluciferin lumineszcenciáját mértük Analyst® GT Multimode Reader (Molecular Devices) segítségével. Az EC₅₀ meghatározás során a dózis-hatás görbét az XLfit (IDBS) programmal generáltuk.

Eredmények

Hatóanyag tervezés és szintézis

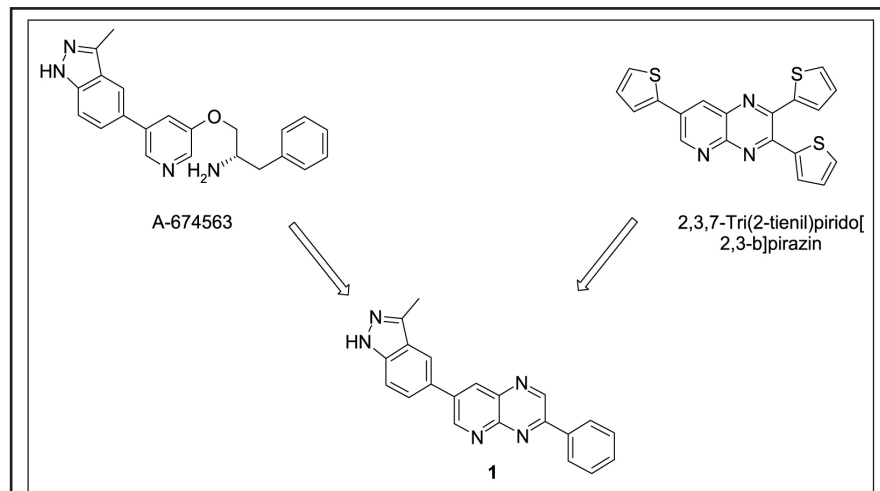
MTS (*medium throughput screening*) szűrés segítségével több mint 1100 ismert, jeltovábbítási rend-

szerhez kapcsolódó, tumor-terápiás célpontot jelentő kinázgátló szer származékait vizsgáltuk, melyek Vichem Chemie Kft. kinázgátló vegyülettárának (Nested Chemical Library™) részét képezték. A vegyületek közt ismert Akt kinázgátló hatású anyagok és azok származékai is megtalálhatóak. Az ilyen hatással rendelkező A-674563 és 2,3,7-tri(2-tienil)pirido[2,3-*b*]pirazin vegyületek szerkezetének kombinálásával új, de az eredeti molekulákkal hasonlóságot mutató származékokat készítettünk (1. ábra).

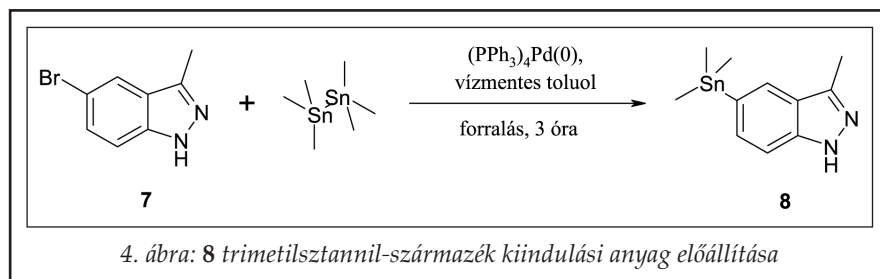
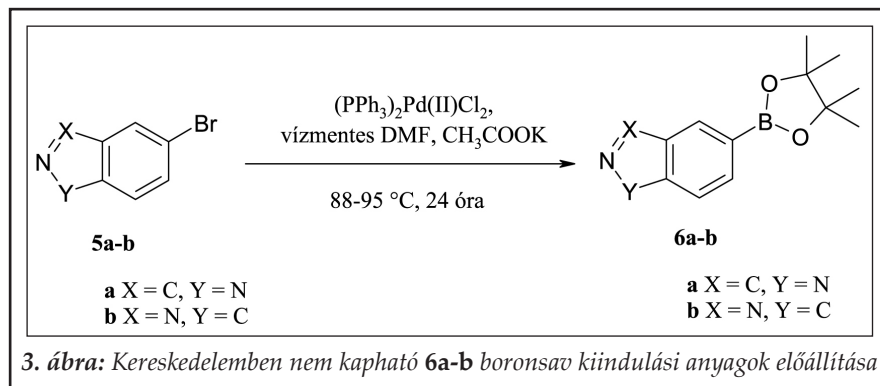
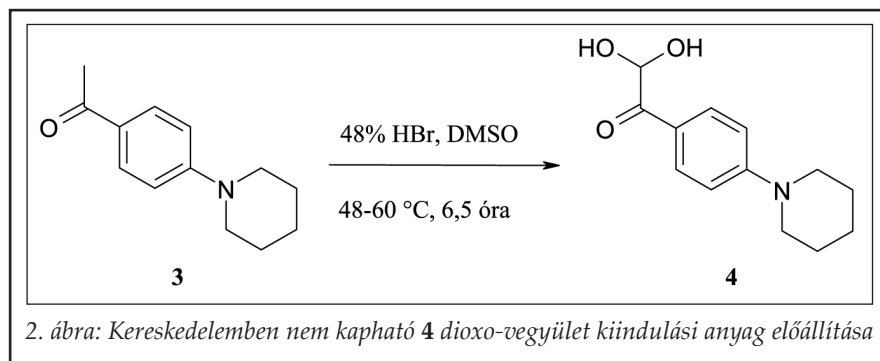
A vegyületek előállítása során első lépésben a pirido[2,3-*b*]pirazin alapvázat alakítottuk ki, amely 7-es helyzetben bróm szubsztituenst tartalmazott. Ezt az 5-brómpiridin-2,3-diamin (2) és a megfelelő dioxo-vegyület kondenzációjával végeztük. A következő lépésben a brómot Suzuki- illetve Stille-reakcióval, boronsav- illetve trimetilsztannil-származék reagenseket felhasználva lecseréltük, és így kapcsoltunk az alapgyűrűhöz aromás és heteroaromás helyettesítőket (5. ábra). A 2,3-diszubsztituált származékok esetében az aromás szén-szén kettős kötés kialakítását az A-674563 vegyület irodalmi szintézisútja alapján Stille-reakcióval végeztük [10], majd a monoszubsztituált származékok esetében áttértünk a preparatív szempontból előnyösebb Suzuki reakcióra. A kereskedelmi forgalomban nem kapható 4 dioxo-vegyületet, a 3-metil-5-(trimetilsztannil)-1*H*-indazolt és két boronsav vegyületet mi állítottunk elő.

A 4 dioxo-vegyületet a megfelelő acetofenon (3) oxidációjával állítottuk elő. 3,00 g (14,78 mmol) 1-[4-(piperidin-1-il)fenil]etanont (3) háromnyakú csiszolatos gömblombikban feloldottunk 33 ml DMSO-ban. Az oldatot felmelegítettük 45 – 50 °C-ra, majd hozzácepegettünk 5,00 ml (44,15 mmol)

48%-os vizes hidrogén-bromidot, ügyelve, hogy a hőmérséklet ne emelkedjen 60 °C fölé. Az elegyet 58 – 75 °C-on kevertettük 2,5 – 5 órát. A reakcióelegyet jégre öntöttük, és kétszer kiráztuk 30 ml etil-acetáttal. Az etil-acetátos fázist 20 ml telített NaCl oldattal mostuk, MgSO₄-on szárítottuk, majd vákuumban bepároltuk. A szilárd anyagot DIPÉ-vel eldörzsöltük és kiszűrtük. A [4-(piperidin-1-il)fenil]jetándiont (4) monohidrát formában preparáltuk (2. ábra).



1. ábra: 1 vegyület szerkezete ismert Akt-kináz gátlószerekből kombinálva



A boronsav vegyületeket a megfelelő bróm-származékból (**5a-b**) állítottuk elő. A bróm-indazolból argonnal kiöblített kétnyakú gömb-lombikban 0,25 M-os vízmentes DMF-es oldatot készítettünk és 0,02 ekvivalens $(\text{PPh}_3)_2\text{Pd(II)Cl}_2$ -ot hozzáadva egy órát kevertettük szobahőmérsékleten, argon atmoszférában. Hozzáadtunk 1,3 ekvivalens bisz(pinakolato)diboránt és 3,5 ekvivalens kálium-acetátot, majd 88 – 95 °C-on 24 órát kevertettük. Az elegyet lehűtöttük, celiten szűrtük, etil-acetáttal háromszor mostuk, és a szűrletet vákuumban bepároltuk. Az így kapott sárga kristályokat hexánból átkristályosítottuk, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottuk. Így állítottuk elő a (1*H*-indazol-5-il)-boronsav-pinakol-észtert és a (1*H*-indazol-6-il)-boronsav-pinakol-észtert (**6a-b**, **3. ábra**).

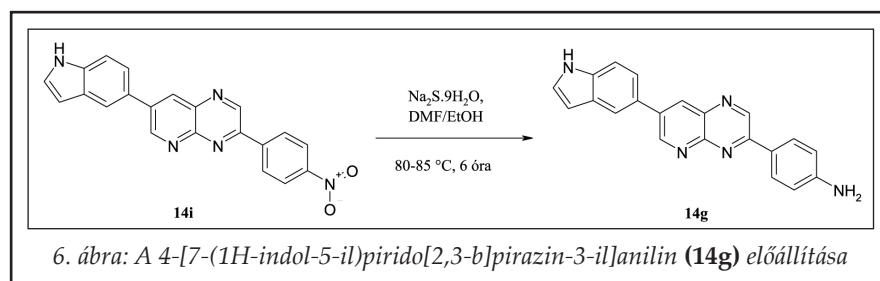
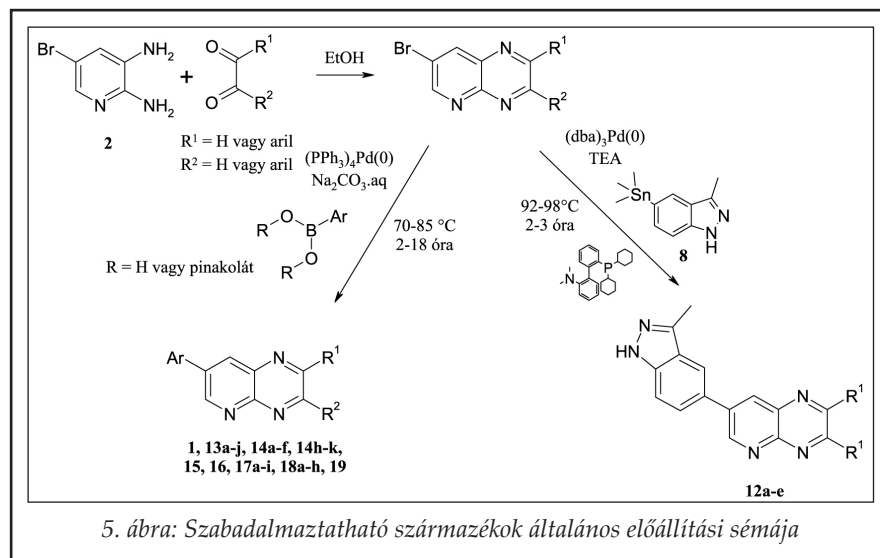
A 3-metil-5-(trimetilsztannil)-1*H*-indazolt (**8**) a megfelelő bróm-vegyületből állítottuk elő (**7**). 4,00 g (18,96 mmol) **7** indazol vegyületet argonnal kiöblített kétnyakú gömb-lombikban feloldottuk 60

ml vízmentes toluolban, 2,02 g (1,75 mmol) $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd(0)}$ katalizátort hozzáadtunk, és kevertettük 30 percet szobahőmérsékleten, argon atmoszférában. Hozzáadtunk 6,22 g (18,96 mmol) hexametildiszztannánt, és 3 órát forraltuk. Az elegyet lehűtöttük, celiten szűrtük, és 4 x 20 ml toluollal mostuk. A szűrletet vákuumban bepároltuk, a maradékot oszlopkromatográfiával tisztítottuk (töltet: 130 g Szilikagél 60, eluens: hexán:etil-acetát: 1:1) (**4. ábra**).

A kondenzációs reakciót aszimmetrikus oxo-vegyülettel végezve két régióizomer képződése lehetséges: 2 illetve 3 helyzetben szubsztituált pirido[2,3-*b*]pirazin (**8. ábra**). Az izomer köztitermékekből előállított vegyületek biológiai hatása között jelentős különbség van (**13j-15**, **14k-16**; **III. táblázat**), sejtosztódás gátló hatást a 3-as helyzetben szubsztituált vegyület mutat. Az esetek többségében azonban a kondenzáció során az a régióizomer keletkezik túlnyomó

többségben, amelyből kiindulva a jobb hatású vegyületet állíthattuk elő. A nem kívánt régióizomer oldhatósága általában jobb, így az izomerek elválasztása során jól használható módszer volt, hogy a reakcióelegyből kiváló terméket kiszűrtük, így az oldatban maradt mellékterméktől megszabadulhattunk. Az izomerek keletkezésének arányát azonban befolyásolja az aromás gyűrűn található szubsztituens, és a nem kívánt izomer akár összemérhető mennyiségben is keletkezhet. Ezért olyan reakciókörülményeket dolgoztunk ki, amelyben szelektíven a kívánt izomer keletkezik. A reakció a hőmérséklet csökkentésével és savas katalízissel szelektívvé tehető a kívánt izomerre.

A kondenzációt szimmetrikus oxovegyület esetében alkoholos forralással végeztük, aszimmetrikus dioxo-vegyülettel pedig szobahőmérsékleten. A megfelelő dioxo-vegyületből gömb-lombikban 0,4 M-os etanos oldatot készítettünk, hozzáadtunk 0,95 ekvivalens **2** diamint, majd 16 órát forraltuk illetve szobahőmérsékleten kevertettük. Az



elegyet lehűtöttük, szűrtük, etanollal mostuk, és exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottuk (5. ábra).

A diszubsztituált pirido[2,3-*b*]pirazin származékokat Stille-reakcióval állítottuk elő. A 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-származékból argonnal kiöblített kétnyakú gömblombikban 0,05 M-os vízmentes DMF oldatot készítettünk, hozzáadtunk 0,2 ekvivalens $(\text{dba})_3\text{Pd}_2(0)$ katalizátort és 0,1 ekvivalens 2-diciklohexilfoszfano-2'-(*N,N*-dimetilamino) bifenilt, majd szobahőmérsékleten kevertettük argon atmoszférában 90 percet. Hozzáadtunk 0,9 ekvivalens **8** trimetilsztannil-származékot, 1,2 ekvivalens TEA-t, és 2 – 3 órát kevertettük 92 – 98 °C-on. Az elegyet lehűtöttük, szűrtük celiten, 4 x 15 ml DMF-fel mostuk, majd a szűrletet vákuumban bepároltuk. A maradékot 30 ml THF-ben oldottuk, 5 g bázikus alumínium-oxidon átengedtük, 40 ml THF-fel mostuk, majd az oldatot vákuumban bepároltuk. A maradékot oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (töltet: 250-szeres tömegű bázikus alumínium-oxid, eluens gradiens hexán : etil-acetát 1:1, majd tiszta etil-acetát, majd etil-acetát + 1% TEA) (5. ábra).

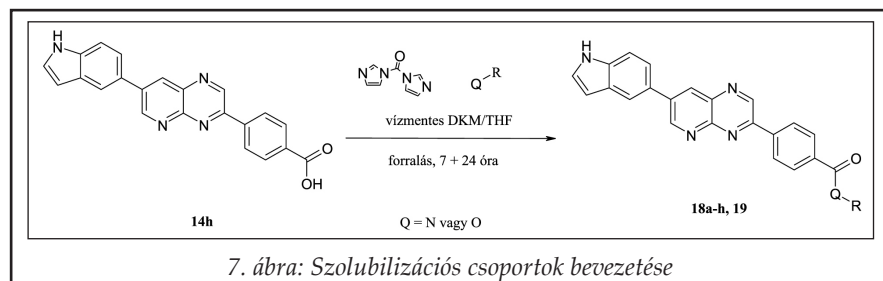
A monoszubsztituált pirido[2,3-*b*]pirazin származékokat Suzuki-reakcióval állítottuk elő. A 7-brómpirido[2,3-*b*]pirazin-származékból argon-

nal kiöblített kétnyakú gömblombikban 0,06 M-os DME oldatot vagy szuszpenziót készítettünk (egyes esetekben DMF hozzáadásával segítettük az oldódást), hozzáadtunk 0,03 ekvivalens $(\text{PPh}_3)_4\text{Pd}(0)$ katalizátort, és az elegyet egy órán át kevertettük szobahőmérsékleten. Ezután hozzáadtunk 1,5 ekvivalens boronsav-vegyületet és 2,75 ekvivalens, 0,66 M-os, vizes Na_2CO_3 oldatot, és 75 – 85 °C-on kevertettük 2 – 18 órát. Az elegyet lehűtöttük, szűrtük, a leszűrt nyerstermék háromszor mostuk telített Na_2CO_3 oldattal és vízzel, majd exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottuk. Amennyiben szükséges volt (ha a reakció során kivált a palládium katalizátor, vagy ha nem volt megfelelő a tisztaság), a terméket átkristályosítással, preparatív

VRK segítségével vagy oszlopkromatográfiásan tisztítottuk (5. ábra).

A **14g** anilin vegyületet DMF és etanol oldószer-elegyben, nátrium-szulfiddal állítottuk a megfelelő nitro-vegyületből. 2,00 g (5,45 mmol) **14i** nitro-vegyületet gömblombikban szuszpendáltuk 50 ml DMF és 50 ml etanol elegyében, és 80 – 85 °C-on kevertettük. Hozzáadtunk 2,50 g (10,42 mmol) nátrium-szulfid nonahidrátot 150 ml etanos szuszpenzióban, majd 6 órán keresztül óránként 2,50 g (6 · 10,42 mmol) szilárd nátrium-szulfidot. A reakcióelegyet lehűtöttük, és szűrtük. A kiszűrt kristályokat 180 ml vízben 1 órát kevertettük, majd szűrtük, kétszer vízzel és háromszor etil-acetáttal mostam, a kristályokat exsikkátorban, foszfor-pentoxid felett tömegállandóságig szárítottuk (6. ábra).

A vízdoldhatóság javítása érdekében szolubilizációs csoportokat vittünk a jó sejtszótódás gátló hatással rendelkező **13j** vegyületbe, savamid csoporton keresztül; továbbá szintetizáltunk egy észter származékot is. Ezen származékokat a **14h** karbonsav vegyületen keresztül állítottuk elő. A megfelelő karbonsav-származékból gömblombikban 0,01 M-os oldatot vagy híg szuszpenziót készítettünk vízmentes DKM és vízmentes THF 1:1 arányú elegyében és hozzáadtunk 1,1 ekvivalens 1,1'-karbonil-diimidazolt. 7 órát forraltuk, majd

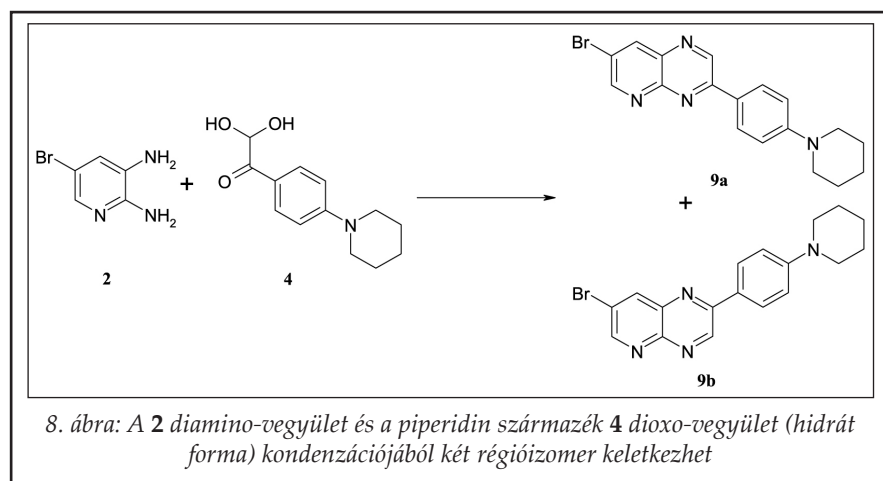


A kondenzációs reakció régióizomériájának vizsgálata, szelektivitásának optimalizálása és a régióizomerek azonosítása

A diamin- és dioxo-vegyületek kondenzációjának szelektivitását különböző reakciókörülmények változtatásával optimalizáltuk.

A kiinduló anyagokból 42,6 mM-os oldatokat készítettünk (DMF, ecetsav, trifluorecetsav – TFA), a katalizátort (amennyiben volt) a diaminvegyület oldatához mértük, és a vizsgálni kívánt hőmérsékleten temperált oldatokat elegyítettük. A régióizomerek arányát HPLC-MS segítségével határoztuk meg a homogén reakcióelegyből vett mintából.

Szobahőmérsékleten, DMF



hozzáadtunk 1,16 ekvivalens megfelelő vízmentes amint vagy alkoholt 0,5 M-os vízmentes THF oldatban. Az elegyet 24 órát forraltuk, majd (a kiindulási karbonsav-származék tömegének 20-szorosával azonos mennyiségű) bázikus alumínium-oxid töltetű oszlopon átfolyattuk. Az oldatot vákuumban bepároltuk, a maradékot pedig oszlop-kromatográfiásan tisztítottuk (töltet: 350-szeres tömegű Szilikagél 60, eluens kloroform : metanol 20:1 - 10:1 - 10:1 + 1% TEA gradiens) (7. ábra).

oldószerben az izomerarány 9a:9b 58:42 volt. A hőmérséklet csökkentésének hatására a kívánt 3-szubsztituált származék szelektívebben keletkezett, bár a reakció idő jelentősen megnőtt. –25 °C-on a reakció 60 nap után gyakorlatilag meg is állt. 70 és 120 °C-on bomlástermék megjelenése volt tapasztalható (I. táblázat).

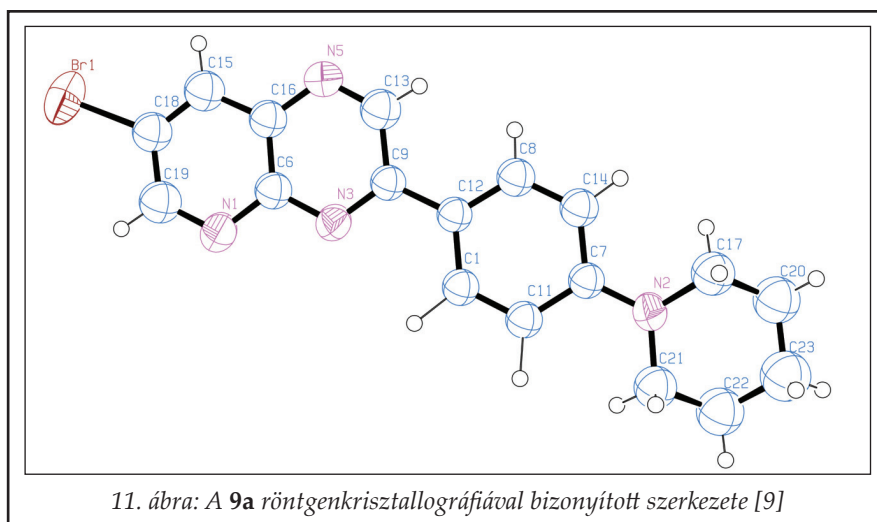
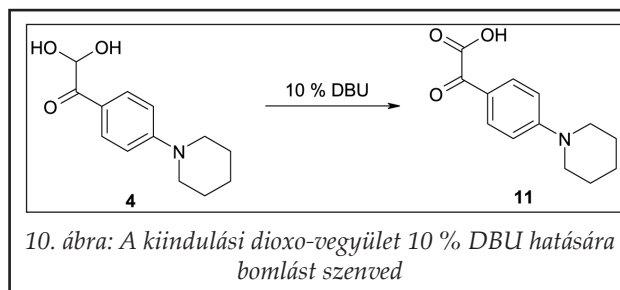
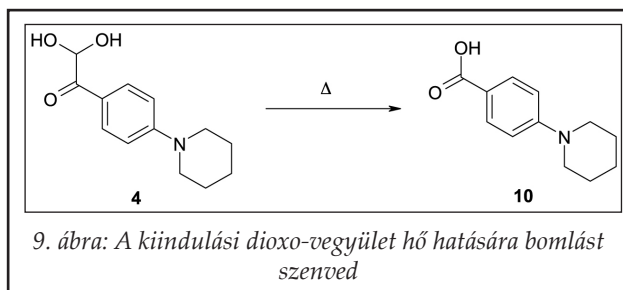
Bázikus katalízis hatására (10% DBU) szintén bomlástermékek megjelenése volt észlelhető, azonban a savas közeg nem csak a szelektivitást

I. táblázat

A reakció szelektivitása és a reakcióidő különböző körülmények között

Oldószer	Hőmérséklet (°C)	Katalizátor	Izomer arány (9a:9b)	Reakció idő	Megjegyzés
DMF	-25		93:7	60 nap ^a	
DMF	0		71:29	25 nap	
DMF	szobahőm.		58:42	8 nap	
DMF	70		42:58	3 óra	bomlás
DMF	120		42:58	<20 perc	bomlás
DMF	szobahőm.	10% DBU			bomlás
DMF	szobahőm.	5 ekv. ecetsav	70:30		
ecetsav	szobahőm.		84:16	40 perc	
TFA:DMF 1:3	szobahőm.		79:21	1,5 óra	
TFA:DMF 3:1	szobahőm.		92:8	<20 perc	
TFA	szobahőm.		96:4	<20 perc	
TFA	0		98:2	5 óra	

^a A reakció nem teljes, 2 42%-a illetve 4 44%-a jelen van a reakcióelegyből



javította, hanem a reakciósebességet is növelte. Az oldószer sűrűségének növelése (ecetsav és trifluoecetsav) és töménysége egyaránt kedvező hatással volt a szelektivitásra (*I. táblázat*).

A reakciót 0 °C-on, tiszta ecetsavban végezve a nemkívánt izomer mindössze 2%-ban keletkezett (*I. táblázat*).

Hő hatására a dioxo-vegyület bomlása volt megfigyelhető. ¹H-NMR és LCMS mérés segítségével a 4-(piperidin-1-yl)benzoic acidet azonosítottuk bomlástermékként (**10**) (*9. ábra*).

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,14 (br s, 1H, COOH), 7,74 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H, 2-CH + 6-CH) 6,92 (d, *J* = 8,40 Hz, 2H, 3-CH + 5-CH), 3,32 (m, 4H, 2-CH₂ + 6-CH₂-piperidin), 1,58 (m, 6H, 3-CH₂ + 4-CH₂ + 5-CH₂-piperidin).

LCMS *m/z* 206 (*M* + *H*)⁺, Rt: 3,06 min.

10% DBU hatására többféle bomlásterméket is

detektálhattunk. Az egyik a korábban is beazonosított **10**, a másik pedig az oxo[4-(piperidin-1-yl)fenil]ecetsav (**11**) volt (*10. ábra*).

LCMS *m/z* 234 (*M* + *H*)⁺, Rt: 3,54 min.

A régióizomerek jellemzése HPLC retenciók idejükkal (retenciók ideje: **9a** 9,37 perc, **9b** 9,96 perc) és az NMR spektrumaikkal történt. Tömegspektrometriás fragmentjeikben és az UV spektrumaikban nem mutatkozott szignifikáns különbség.

9b izomer HMQC mérése – amivel a három kötés távolságban lévő ¹H-¹³C csatolásokat mértünk – kimutatta, hogy 3-CH (9,45) csatol a N⁴CN⁵ szénatommal (148,43), ami szintén csatol 6-CH (9,00) atommal. Azonban **9a** izomer HMQC mérésekor 2-CH (9,33) csak egy nagyon gyenge csatolást ad 4a-C szénatommal (149,69). Következésképpen 2-CH és 4a-C több, mint három kötés távolságban van egymástól, ami **9b** izomer szerkezetét bizonyítja (*II. táblázat*).

9a izomer NOE vizsgálata során 2-CH (9,33) erős keresztcsúcsot adott a fenil-csoport 2'-CH (8,23) atommal, és egy gyenge keresztcsúcsot a 8-CH (8,51) atommal. Ez a gyenge keresztcsúcs következtetn enged 2-CH és 8-CH térbeli közelségére. Mivel ez a keresztcsúcs nem található meg **9b** izomer NOE spektrumában, így **9a** szerkezete bizonyítható (*II. táblázat*).

II. táblázat

Régióizomerek szerkezetét igazoló NMR (500 MHz, CDCl₃) adatok

Vegyület	HMQC	NOE
9a	(140 Hz, 8 Hz): 9,33-(154,49, 135,98), 9,07-(149,69, 139,21, 118,83), 8,51-(154,81, 149,69, 118,83), 8,23-(153,45, 129,28), 6,99-(123,91, 114,67), 3,37-(153,45, 48,74, 25,38, 24,30), 1,70-(48,74, 24,30), 1,66-25,38	9,33 - (8,51, 8,23)
9b	(140 Hz, 8 Hz): 9,45-(153,12, 148,43), 9,00-(148,43, 139,23, 121,05), 8,53-(152,84, 148,43, 121,05), 8,10-(153,34, 153,12, 128,87), 6,99-(124,13, 114,89), 3,36-(153,34, 48,86, 25,37, 24,30), 1,71-(48,86, 25,37, 24,30), 1,66-(48,86, 25,37)	9,45 - 8,10

A **9a** izomer szerkezetét röntgenkristallográfiával is bizonyítottuk. A méréshez használt egykristályt az anyag 1,4-dioxános oldatából kristályosítottuk 9 nap alatt. Az eredmények igazolták, hogy **9a** szerkezete a 7-bróm-3-[4-(piperidin-1-il)fenil]pirido[2,3-*b*]pirazin, tehát az az izomer, amikor **2** 3-amino-reagál **4** aldehid-csoportjával, és a 2-amino-csoport a keton-csoporttal (**11. ábra**).

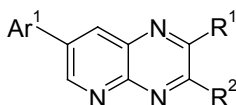
Hatásoptimalizálás PC9 és PC9-ER sejtvonalakon

A vegyülettár részét képezték a 2,3-diszubsztituált pirido [2,3-*b*]pirazinok és egy monoszubsztituált származék (**1**). A legjobb sejtosztódás gátló hatással a monoszubsztituált származék rendelkezett, ez került ki találati-, úgynevezett hit-molekulaként. A következő lépésben a 7-es helyzetű aromás gyűrűket változtattuk. A hatáshoz szükséges

volt, hogy ebben a pozícióban nitrogén tartalmú heterociklus legyen, a megfelelő kapcsolódási hellyel. A hatékony molekulák 7-es pozíciójában szubsztituátlan indol-4- illetve -5-il csoportot, vagy indazol-5-il csoportot tartalmaztak. A harmadik fejlesztési ciklus során kiderült, hogy a 2-es helyzet szubsztitúciója, továbbá a 3-as helyzet szubsztituátlanlansága rontja az anyagok sejtproliferáció gátló hatását. A következő iterációs lépésben a 3-fenil gyűrűt szubsztituáltuk. A legjobb hatású a 2-metoxi, 3-klór, 4- morfolinil, 4-piperidinil, 4-metoxi, 3,4-etiléndioxi szubsztitúció volt. A jó EC₅₀ értékű **13j** vegyületen alifás amint tartalmazó láncokat alakítottunk ki savamid kötésen keresztül a vízdoldhatóság javítása céljából. Továbbá előállítottunk egy észter származékot is. Bár ezek vízdoldhatósága jobb volt, mint a kiindulási anyagoké, a sejtosztódás gátló hatásuk csökkent (**III. táblázat**).

III. táblázat

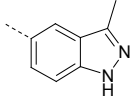


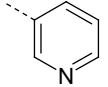

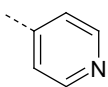

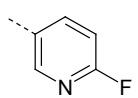

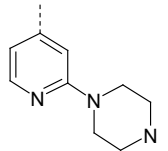

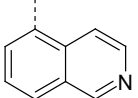

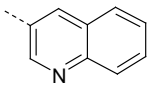

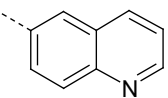

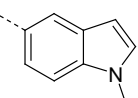

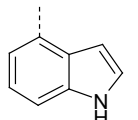

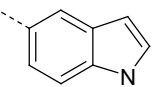

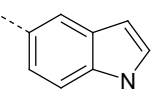

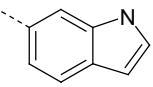

A pirido[2,3-*b*]pirazin származékok sejtosztódás gátló hatásai



Vegyület	Ar ¹	R ¹	R ²	PC9 (EC ₅₀ ; μM)	PC9-ER (EC ₅₀ ; μM)
Erlotinib				0,005	5,65
A-674563				0,91	0,82
2,3,7-Tri(2-tienil)pirido[2,3- <i>b</i>]pirazin				>30	15,64
1		H		1,86	2,34
12a				>30	21,97
12b				11,60	18,27
12c				6,90	5,74
12d				>30	>30

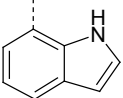

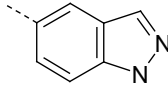

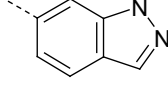

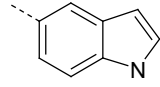
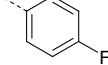
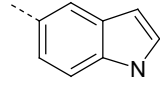
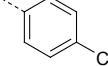
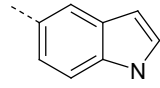
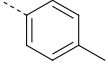
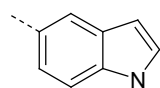
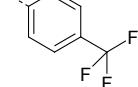
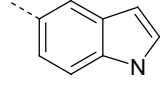
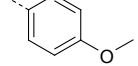
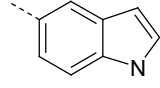
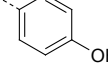
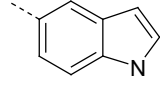
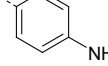
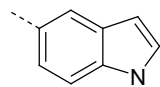
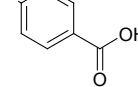
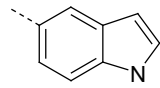
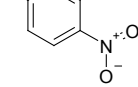
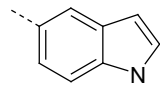
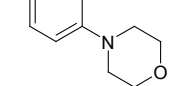
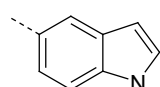
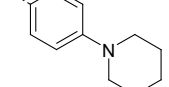
Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Vegyület	Ar ¹	R ¹	R ²	PC9 (EC ₅₀ ; μM)	PC9-ER (EC ₅₀ ; μM)
12e				10,77	11,01
13a		H		11,30	11,11
13b		H		>30	>30
13c		H		>30	>30
13d		H		6,29	8,96
13e		H		>30	30,00
13f		H		>30	>30
13g		H		>30	>30
13h		H		>30	>30
13i		H		0,78	2,56
13j		H		0,36	4,43
15			H	18,42	23,02
13k		H		>30	>30

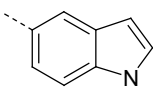
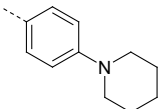
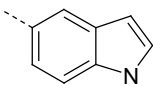
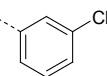
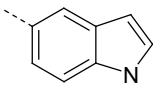
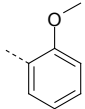
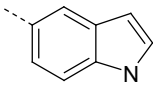
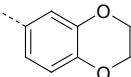
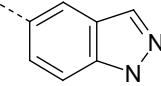
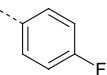
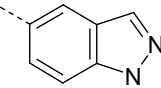
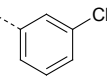
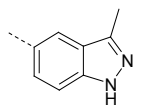
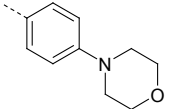
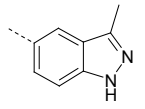
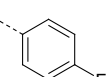
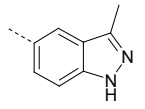
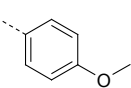
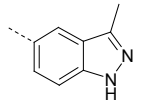
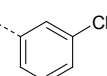
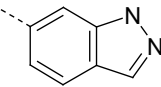
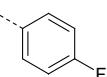
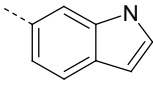
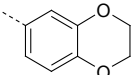
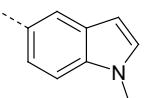
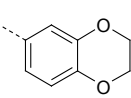
Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Vegyület	Ar ¹	R ¹	R ²	PC9 (EC ₅₀ ; μM)	PC9-ER (EC ₅₀ ; μM)
13l		H		>30	>30
13m		H		1,28	1,39
13n		H		>30	>30
14a		H		0,94	1,02
14b		H		>30	>30
14c		H		>30	>30
14d		H		7,89	10,01
14e		H		1,11	9,40
14f		H		4,31	9,10
14g		H		10,33	5,53
14h		H		>30	>30
14i		H		>30	>30
14j		H		0,32	0,59
14k		H		0,14	0,20

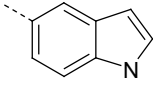
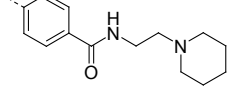
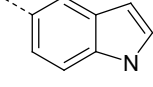
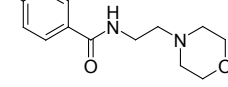
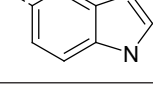
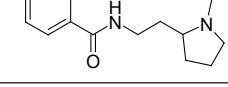
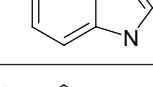
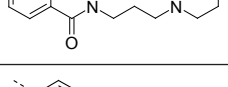
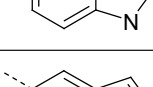
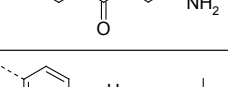
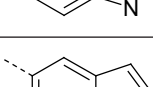
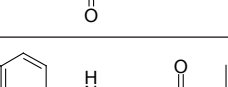
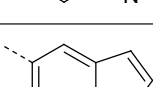
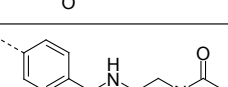
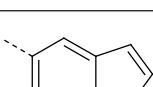
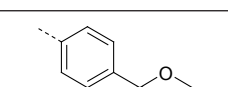

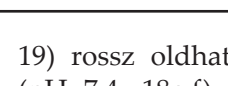
Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Vegyület	Ar ¹	R ¹	R ²	PC9 (EC ₅₀ ; μM)	PC9-ER (EC ₅₀ ; μM)
16			H	9,03	12,88
14l		H		0,87	1,29
14m		H		0,10	0,36
14n		H		0,09	0,15
17a		H		>30	>30
17b		H		0,25	0,30
17c		H		2,33	17,95
17d		H		25,03	27,58
17e		H		0,53	0,47
17f		H		>30	>30
17g		H		>30	>30
17h		H		10,55	13,45
17i		H		0,49	0,57

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Vegyület	Ar ¹	R ¹	R ²	PC9 (EC ₅₀ ; μM)	PC9-ER (EC ₅₀ ; μM)
18a		H		3,19	3,97
18b		H		3,62	11,34
18c		H		2,87	5,99
18d		H		2,72	4,71
18e		H		27,72	19,65
18f		H		2,93	4,54
18g		H		6,91	24,29
18h		H		4,13	>30
19		H		16,36	29,67

Vízoldhatóság

A vízoldhatóság javítása érdekében a hatékony **13j** molekulába épített savamid- (és egy észter-) csoportok általánosan ténylegesen növelték a molekulák vízoldhatóságát pH 7,4 és 2,0-n. Az alifás amint tartalmazó származékok vízoldhatósága javult, savas pH-n jelentősebb mértékben, legkevésbé a primer amin tartalmú vegyületé. Az amid származékok vízoldhatósága savas pH-n nem változott, de pH 7,4-en javult. A **19** észter-származék vízoldhatósága a kiindulási vegyülethez képest nem javult (**12. ábra**).

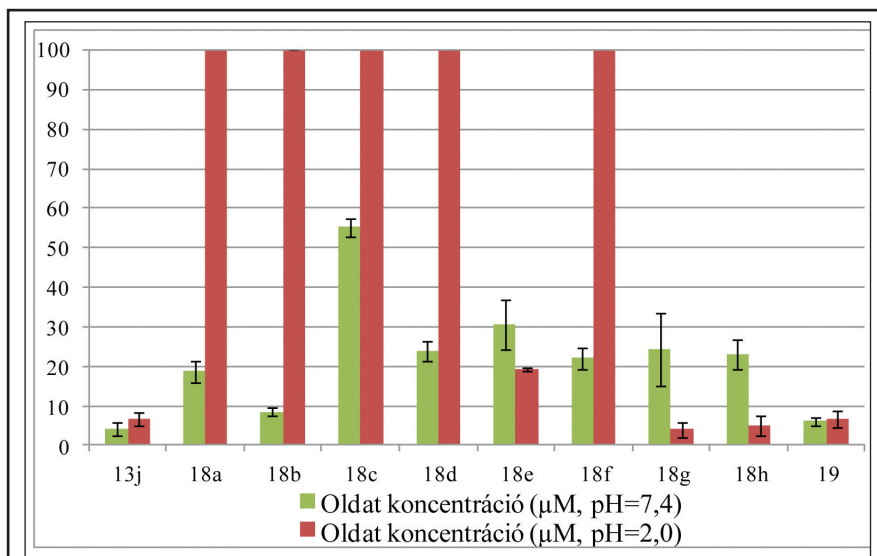
A tíz vegyület oldhatóságát JChem szoftverrel becsültük. A számított értékek mért értékekkel való korrelálhatóságát a **13. ábrán** szemléltetjük. A tíz mérési pontból a JChem szoftver 7 mérési pont esetében (pH 7,4: **13j**, **18b**, **19**; pH 2,0: **13j**, **18g-h**,

19) rossz oldhatóságot, 4 mérési pont esetében (pH 7,4: **18c-f**) közepes oldhatóságot, 4 mérési pont esetén jó oldhatóságot prediktált (pH 2,0: **18a,c,d,f**), ami összhangban volt a mérési eredményeinkkel (**13. ábra**).

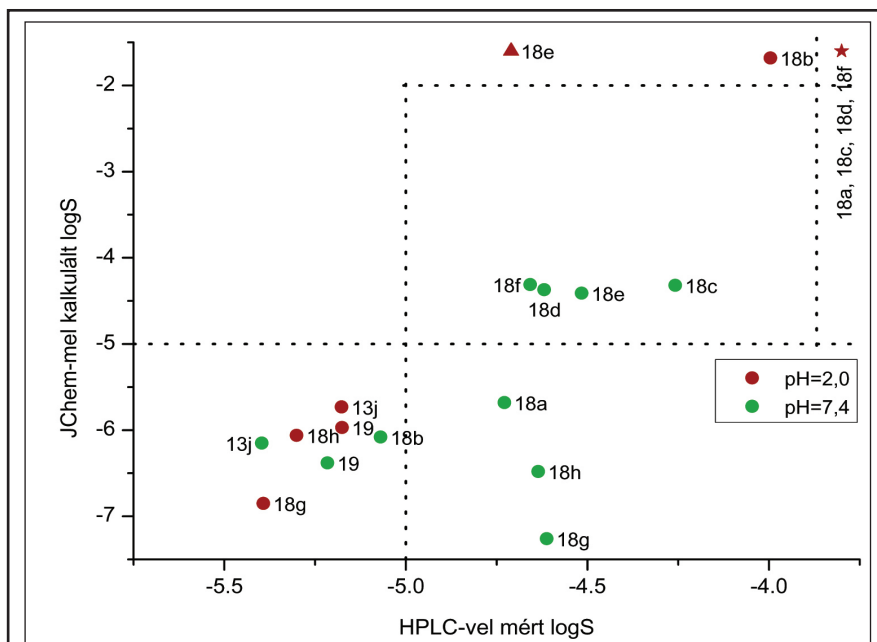
Szerkezet-hatás összefüggés

A sejtprolifráció gátló hatáshoz szükséges szerkezeti elemek összefoglalva a következők:

- a pirido[2,3-*b*]pirazin alapváz 2-es pozíciója szubsztituátlan maradjon;
- 7-es helyzetben lévő szubsztituens 4-indolil, 5-indolil vagy 5-indazolil heteroaromás gyűrű legyen, aminek az 1'-es pozícióban lévő nitrogénje szubsztituátlan, tehát a megfelelő pozícióban lévő NH esszenciális;



12. ábra: Tíz származék μM -ban megadott vízoldhatósága pH 7,4 és 2,0-n. A 100 μM -nál többnek mért oldhatóság értékeit teljes beoldódásnak tekintettük



13. ábra: A kalkulált értékek mért értékekkel való korrelálhatósága. A háromszöggel jelölt vegyület esetén a JChem 0-nál nagyobb vagy egyenlő logS értéket becsült. A 100 μM -nál többnek mért oldhatóság értékeit teljes beoldódásnak vettük, és az ábrán csillaggal jelöltük

c) a 3-as pozícióban lévő fenil szubsztituensek közül a legjobb hatással a 3,4-etiléndioxicoportot tartalmazó **14n** rendelkezik a vizsgáltak közül.

zetét igazoltuk és a reakciókörülmények szelektivitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, a régióizomerek elválasztására módszert dolgoztunk ki, és a reakciót optimalizáltuk.

Következtetések

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a kitzűött céloknak megfelelően ismert kinázgátló vegyületek alapvázát kombinálva állítottunk elő és

vizsgáltunk új származékokat, amelyek sejtosztódás gátló hatását meghatároztuk kétféle daganatos sejtvonalon, egy erlotinib-érzékeny PC9 sejtvonalon, és erlotinib-rezisztens mutánsán. Az eredmények alapján szerkezet-hatás összefüggést állítottunk fel, ami alapján a további szintéziseket terveztük. Ennek során a szubsztituensek szisztematikus cseréjével állítottunk elő új származékokat. A legjobb hatású szerkezetet alapul véve várhatóan jobb oldhatósággal rendelkező származékokat terveztünk és szintetizáltunk. Az oldhatóságot tudtuk javítani, de ez a hatás csökkenését eredményezte.

A legjobb hatású vegyület **14n** nagyságrendileg ugyanolyan mértékben gátolta az erlotinib-érzékeny sejtvonalat, mint az erlotinib (**14n** 0,09 μM , erlotinib 0,005 μM) de az erlotinib-rezisztens sejtvonalat több mint 30-szoros mértékben (**14n** 0,15 μM , erlotinib 5,65 μM). Ez alapján kijelenthetjük, hogy sikerült olyan anyagot kifejlesztenünk, amely az erlotinib-érzékeny és az erlotinib-rezisztens sejtvonalak gátlására egyaránt alkalmas.

A szintézis során az alapszerkezet kétféle régióizomerjének keletkezésére van mód egy kondenzációs lépésben. A kívánt, jó biológiai hatással rendelkező származék szerke-

Támogatás

A kutatás a STEMKILL pályázat (TECH_08_A2-STEMKILL) keretében valósult meg. Köszönetet mondunk *Dancsó Andrásnak*, az Egis Gyógyszer-

gyár Zrt. munkatársának a NMR analízisben és röntgenkristallográfiában nyújtott segítségével és hasznos tanácsaiért. A vegyületek oldhatóságának kalkulációját a következő szoftverrel végeztük: JChem. Calculator Plugins, Marvin 6.3.1, 2014, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>).

IRODALOM

1. Kéri Gy., Ullrich A.: Cancer as a communication disorder. In: Kéri Gy, Toth I (szerk.), Molecular pathomechanisms and new trends in drug research. Taylor & Francis, London, 2003: 227-247.
2. Shchemelinin I, Šefc L, Nečas E.: Folia Biol (Praha) 52(4), 137-148 (2006).
3. Mok TSK, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M.: N Engl J Med 361(10), 947-957 (2009).
4. Costa DB, Nguyen KS, Cho BC, Sequist LV, Jackman DM, Riely GJ, Yeap BY, Halmos B, Kim JH, Jänne PA, Huberman MS, Pao W, Tenen DG, Kobayashi S.: Clin. Cancer Res, 14(21), 7060-7067 (2008).
5. Kim SM, Kwon OJ, Hong YK, Kim JH, Solca F, Ha SJ, Soo RA, Christensen JG, Lee JH, Cho BC.: Mol Cancer Ther 11(10), 2254-2264 (2012).
6. Riely GJ, Pao W, Pham D, Li AR, Rizvi N, Venkatraman ES, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA.: Clin Cancer Res 12, 839-844 (2006).
7. Engelman JA, Jänne PA.: Clin Cancer Res 14(10), 2895-2899 (2008).
8. Kékesi L, Sipos A, Németh G, Pató J, Breza N, Baska F, Órfi L, Kéri G.: Bioorg Med Chem Lett 23(22), 6152-6155 (2013).
9. Kékesi L, Dancsó A, Illyés E, Boros S, Pató J, Greff Z, Németh G, Garamvölgyi R, Baska F, Órfi L, Kéri Gy.: Lett in Org Chem 11(9), 651-656 (2014).
10. Thomas SA, Li T, Woods KW, Song X, Packard G, Fischer JP, Diebold RB, Liu X, Shi Y, Klinghofer V, Johnson EF, Bouska JJ, Olson A, Guan R, Magnone SR, Marsh K, Luo Y, Rosenberg SH, Giranda VL, Li Q.: Bioorg Med Chem Lett 16(14), 3740-3744 (2006).

Érkezett: 2014. szeptember 14.

Az *Epilobium angustifolium* L. (erdei deréce) fitokémiai és antimikrobás hatásának vizsgálata

SILLÓ SZABOLCS¹, VARGA ERZSÉBET^{*1}, BELÁK ÁGNES², MARÁZ ANNA²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Farmakognózia és Fitoterápia Tanszék, Marosvásárhely, Románia

²Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék, Budapest, Magyarország
Levelezési cím: Dr. Varga Erzsébet, Str. Gh. Marinescu, nr.39
540 349 Tg. Mures, RO
e-mail: verzsebet@yahoo.com

Summary

Silló Sz., Varga E., Belák Á., Maráz A.: **Phytochemical and antimicrobial investigation of *Epilobium angustifolium* L.**

Phytochemical studies of *Epilobium angustifolium* herba aimed the determination of the active ingredients; antimicrobial activity of the aqueous and ethanolic extracts against human pathogenic bacteria and fungi was also examined. Six flavonoid and 4 phytosterol fractions were identified by thin layer chromatography, while tannins were present in low concentration. It has been shown that not only the ethanolic but also the aqueous extracts had inhibitory effect on certain pathogenic microorganisms, therefore *E. angustifolium* could be used for the development of external phytotherapeutic or disinfectant preparations.

Key words: *Epilobium angustifolium*, phytochemie, microbiology

Összefoglalás

A fitokémiai vizsgálatok során meghatároztuk az *Epilobium angustifolium* herba-ban lévő hatóanyagokat, valamint megvizsgáltuk a vizes és etanolos kivonatok gátló hatását patogén baktériumok és gombák ellen. Vékonyréteg-kromatográfiás módszerrel 6 flavonoid és 4 fitoszterol frakciót mutattunk ki, míg cserzőanyagok kis koncentrációban voltak jelen. Eredményeink szerint az *E. angustifolium*-nak nemcsak az etanolos, hanem a vizes kivonata is különböző mértékben gátolja egyes patogén mikroorganizmusok szaporodását, ami alapul szolgálhat külsőleg alkalmazandó fitoterápiás vagy fertőtlenítő hatású készítmények kifejlesztésére.

Kulcsszavak: *Epilobium angustifolium*, fitokémia, mikrobiológia

Bevezetés

Az erdélyi népgyógyászati leírások gyakran hivatkoznak az *Epilobium parviflorum*-ra, és a belőle előállított készítményt forgalmazzák is a jóindulatú prosztata megnagyobbodás kezelésére. A hazai dombvidékek és hegyvidékek spontán flórájában gyakori *Epilobium angustifolium*-nak azonban mindeddig csak gyulladáscsökkentő hatásáról számoltak be a tudományos közlemények. Kísérleteink célja az volt, hogy az *E. parviflorum* mellett az *E. angustifolium* fitokémiai vizsgálatát is elvégezzük, ami a tartalmi anyagok minőségi és mennyiségi meghatározására és a hatóanyagok felderítésére irányult. További célkitűzésünk volt, hogy megvizsgáljuk az *Epilobium angustifolium*-ból készített kivonatoknak különböző patogén baktérium és gomba fajokkal szembeni antimikrobás hatását. Arra a kérdésre kerestük a választ, hogy laboratóriumi körülmények között azonosítani tud-

juk-e a hatásokért felelős hatóanyagokat és kimutatható-e antimikrobás hatás.

Az *Epilobium* nemzetség

Az *Epilobium* fajok az egész világon elterjedtek, Európában, Ázsiában, Afrikában, Amerikában, Ausztráliában és Új-Zélandon is előfordulnak. Nagyrésztük a mérsékelt égövben található, legelterjedtebbek az Északi félgömb 35. és 60. szélességi fokai között [1]. Kedvelt élőhelyeik az erdei árokpartok, tisztások, legelők, mocsaras, tőzeges területek [2]. Az *Epilobium angustifolium* L. növényrendszertani besorolása hosszú ideig vita tárgyát képezte. Egyes botanikai szakvélemények szerint az *Epilobium* nemzetségből el kellett különíteni egy önálló csoportot, amelyet elsősorban a virágok morfológiájával indokoltak, és ez a *Chamaerion* nemzetség volt. 1973-ban újra összevonták a két nemzetséget, megtartva az *Epilobium* elnevezést. A

legújabb botanikai és kemotaxonómiai vélemények szerint az *Epilobium parviflorum* és az *Epilobium angustifolium* egyaránt az *Epilobium* fajok közé sorolandó [1, 3].

Az *Epilobium* fajok fitokémiai jellemzői

Az *Epilobium* fajok gyógyászati célra felhasznált növényi részei a virágos hajtások. Ezekben a növényi részekben található a legnagyobb koncentrációban a hatásokért felelős vegyületek: flavonoidok és származékaik (miricetol, izokvercitol, kvercitol, guaiaverin, kemferol, kvercetin-3-O-béta-D-glukuronid), cserzőanyagok (galluszsav és származékai, ellágotannin, gallotannin makrociklikus származékai), antociánok (malvidin), fenolkarbonsavak (kávéssav, klorogénsav, galluszsav, ellágsav). Az *E. parviflorum* és az *E. angustifolium* fitoszterolokat (beta-szitoszterol, észter vegyületeik és glikozidjaik) is tartalmaz. Az *Epilobium* fajoknál kimutatták a pektinek, zsírsavak (palmitinsav, sztearinsav, oleinsav, arachidonsav, linolénsav) és a poliholozidok jelenlétét is [1, 3].

Az *Epilobium* fajok farmakológiai jellemzői

Az *Epilobium* fajokra vonatkozóan a következő hatásokat publikálták. A legkifejezettebb antibakteriális és antimikotikus hatással az *E. angustifolium* és az *E. rosmarinifolium* rendelkezik [16]. A gyulladáscsökkentő hatású etanolos és vizes kivonatok gátolják a ciklooxygenáz enzimek (COX-1 és COX-2) működését, valamint a gyulladásos folyamatokért felelős mediátorok, prosztaglandinok felszabadulását [3,5]. Az antioxidáns hatás az *Epilobium* fajok magas polifenol tartalmával magyarázható [4].

Kísérleti rész

Kísérleteinket a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem Gyógynövénykertjében termesztett *E. angustifolium*-mal végeztük.

1. Mikroszkópos vizsgálatok

A vizsgálatokhoz az *E. angustifolii* herba-t vízben áztattuk és laboratóriumi körülmények között keresztmetszeteket készítettünk a levelekből és a szárból, majd klorálhidráttal derítettük, glicerinbe ágyaztuk és laboratóriumi fénymikroszkópokkal vizsgáltuk [6].

2. Fitokémiai vizsgálatok

A fitokémiai vizsgálatainknál az *E. angustifolium*-ot kereskedelemről származó *E. parviflorum*-mal hasonlítottuk össze.

2.1. Vékonyréteg kromatográfia (VRK)

2.1.1. Polifenolok meghatározása az *E. angustifolium* és az *E. parviflorum* fajokból [6, 7]

Minták: az *Epilobii angustifolii* herba és az *Epilobii parviflorii* herba metanolos kivonatait vizsgáltuk.

Etalonok: klorogénsav, kávéssav, kvercetin és rutozid metanolban.

Állófázis: szilikagél Alugram[®] SIL G;

Mozgófázis: (1) kloroform:ecetsav:metanol:víz (60:32:12:8); (2) etil-acetát:metil etil keton:hangyasav:víz (5:3:1:1). A kromatogramok vizsgálata 365 nm-es UV fényben történt, 1%-os AlCl₃-al való előhívást követően.

2.1.2. Növényi szterolok meghatározása az *E.*

angustifolium és az *E. parviflorum* fajokból [6, 8, 9]

Az előkészített növényi részekből kloroformos, metanolos és kloroform:metanolos keverékben (2:1) kivonatokat készítettünk. Két mozgófázist használtunk. Etalonok: tojássárgája kloroform:metanol keverékben (2:1). Állófázis: szilikagél Alugram[®] SIL G; Mozgófázis: (1) petroléter:ecetsav (80:20:1) (2) petroléter:dietiléter:jégecet (65:15:1). A kromatogramok kiértékelése 2,7-diklorofluoreszcein [10] és Rhodamin 6G [11] reagensekkel való előhívás után történt.

2.1.3. A polifenol komponensek összehasonlítása az *E.*

angustifolium etanolos és kloroformos kivonataiban

[10, 12, 13]

A növényi kivonatokat Soxhlet készülékkel állítottuk elő. A kivonást vízfürdőn kloroformmal (kb. 280 ml) 15 g drogból végeztük. Az extrakció ideje kb. 10 óra volt. A kloroformos kivonatot a lehetőségekhez mérten szárazra pároltuk be rotációs vákuumbepárlón (ROTA-VAPOR TIP: RV 05-ST), ezt követően 12 óráig 30-40 °C-on szárítószelekre nyben, majd kb. 48 órig szobahőmérsékleten az állandó súly eléréseig szárítottuk. A beszárított kivonathoz annyi 50%-os etanolt adtunk, hogy a végkoncentráció 0,1 g/ml legyen, majd a kivonást ultrahangos vízfürdőben elvégeztük (Ultrasonic cleaner - mrc D80H). A növényi részek etanolos és kloro-

formos kivonatait vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltuk.

Etalonok: klorogénsav, kávéssav, kvercetin és rutozid metanolban; Állófázis: szilikagél Alugram^R SIL G; Mozgófázis: (1) kloroform:ecetsav:metanol:víz (60:32:12:8) (2) etil-acetát:metil-etil-keton:hangyasav:víz (5:3:1:1). A kromatogramok vizsgálata 365 nm-es UV fényben történt, 1%-os AlCl₃-os előhívást követően.

2.2. Cserzőanyagok mennyiségi meghatározása

A meghatározásokat a X. Román és a VIII. Magyar Gyógyszerkönyv szerint végeztük el, ami a cserzőanyagok redukáló tulajdonságán alapszik. A százaléokban kifejezett cserzőanyag tartalmat pirogalolban kifejezve adtuk meg a gyógyszerkönyv adatai szerint [6, 14, 15]. Három párhuzamos mérést végeztünk mindkét drog esetében 1,25 g szárazanyag bemérésével.

3. Az *E. angustifolium* antimikrobás hatásának vizsgálata

3.1. Hatásvizsgálat agardiffúziós módszerrel

Az *E. angustifolium* etanolos és vizes kivonatainak antimikrobás hatását gátlási zónák kialakulásával vizsgáltuk agardiffúziós módszerrel baktérium és gomba törzsek bevonásával. Az antibakteriális hatást a Gram-pozitív *Bacillus cereus* és *Staphylococcus aureus*, a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* patogén baktériumok, valamint az opportunista humánpatogén *Candida albicans* élesztőgomba szaporodásának gátlása alapján határoztuk meg.

A NUTRIENT táptalajt (húskivonat, élesztőkivonat, pepton, NaCl, agar) a baktérium és gomba törzsek 24 órás tenyészeivel oltottuk be úgy,

hogy a Petri-csészébe kiöntött táptalaj felületére 10⁸ baktérium vagy 10⁶ élesztőgomba sejtet szélesztettünk. A táptalajba 7 mm átmérőjű lyukakat fúrtunk és a lyukakba 100 µl vizsgálandó kivonatot pipettáztunk. A vizsgálandó minták a következők voltak: *E. angustifolium* etanolos (0,31g/ml) és vizes (0,062 g/ml), sterilre szűrt kivonatai, az etanolos kivonat 5x hígítása (0,062 g/ml) és 50%-os, illetve 10%-os etanol kontrollként. A baktériumokat 24 óráig 37 °C-on, a gombát pedig 48 óráig 25 °C-on inkubáltuk. Az eltelt inkubálási idő után lemértük a gátlási zónákat.

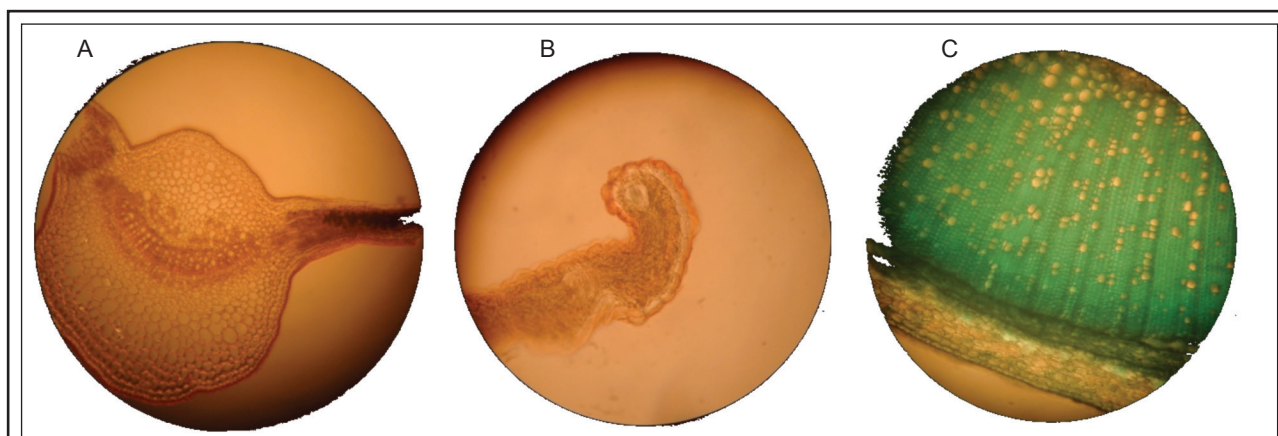
3.2. Az *E. angustifolium* alkoholos és vizes kivonatainak hatásvizsgálata mikrotenyésztésben

Az *E. angustifolium* alkoholos és vizes kivonatainak mikroorganizmusokra gyakorolt hatását mikrolemez tenyészetekkel vizsgáltuk Multiscan Ascent (Thermo Electron Corporation) készülékben. A kiválasztott baktérium és gomba törzsekből 600 nm-en 0,5 OD értékre beállított szuszpenziókat készítettünk, amelyeket 30-szorosra hígítottunk, majd különböző hígításban hozzáadtuk a hatóanyagot. A baktériumok szaporodását 37 °C-on, a gombáét pedig 25 °C-on 24 órán keresztül 595 nm-en mértük.

Eredmények és értékelésük

1. Az *E. angustifolium* mikroszkópos vizsgálata

A mikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján (1. ábra) a levél keresztmetszete dorziventrális szerkezetet mutatott és a következő részeket különböztettük el a főérben: kutikula, felső epidermisz, lemez kollenchima (egy soros a főér felső felén), parenchima, szigetszerű csoportos szklerenchima



1. ábra: Az *E. angustifolii* herba fénymikroszkópos vizsgálata; a főér (A), a levéllemez (B) és a szár (C) keresztmetszete

(felső részben), edénynyalábok – felül fa, alul hancs – összefüggő szklerenchimával, amely a hancsot alulról határolja. Ezt újra parenchima sejtek követik, majd lemezes kollenchima, alsó epidermisz és kutikula figyelhető meg. A levéllemez keresztmetszetében található a kutikula, a felső epidermisz, az oszlopos parenchima, a szivacsos parenchima, az alsó epidermisz és kutikula, míg a levéllemez végén – a lehajló részben – rafid kötegek figyelhetők meg. A szár keresztmetszete másodlagos szerkezetet mutat. Azt az érdekességet figyeltük meg, hogy a külső sejtsor egy le nem váló epidermisz réteget tartalmaz. Ezt követi az egysejtű lemezes kollenchima, kéregparenchima, a hancsedények – kívül elsődleges hancs, utána másodlagos hancs – és a hancsedények közötti szklerenchima. Ezt követően a farész különül el: kívül másodlagos fa bélsugarakkal elválasztva, belül az elsődleges fa és a központi részben a belparenchima.

2. A hatóanyagok elválasztása vékonyréteg kromatográfiával

Az első futatóelegyet [kloroform:ecetsav:metanol: víz (60:32:12:8)] használva az *E. angustifolium* és az *E. parviflorum* fajoknál 4-4 flavonoid frakció volt megfigyelhető, amelyekből 3 ugyanaz a frakció volt, míg a negyedik azonosíthatatlan. Az *E. angustifolium*-nál a flavonoid frakciók színintenzitásából következtetve ez a faj mennyiségileg több flavonoidot tartalmaz az *E. parviflorum*-hoz képest.

A második futatóelegy [etilacetát:metil-etilketon:hangyasav: víz (5:3:1:1)] használatakor az *E. angustifolium*-nál 6, míg az *E. parviflorum*-nál 5 frakció volt megfigyelhető.

3. Az *E. angustifolium* és az *E. parviflorum* fajok polifenol komponensei

A növényi szterolok elválasztása szempontjából legjobbnak a kloroformos kivonatok bizonyultak, mivel ezek esetében különült el a legtöbb frakció. Az etalonokkal összehasonlítva jól látszott, hogy mindkét növényben kimutathatók voltak a növényi szterolok. Az *E. parviflorum*-ban nagyobb mennyiségben találhatók meg a növényi szterolok, mint az *E. angustifolium*-ban, ami magyarázata lehet a jóindulatú prosztatata megnagyobbodásban történő alkalmazásának. A két előhívó elegy közül a Rhodamin 6G bizonyult jobbnak, mert sokkal több frakciót mutatott ki, mint a 2,7-dikloro-fluorescein.

A kloroform:ecetsav:metanol: víz (60:32:12:8) futató elegy használatakor az *E. angustifolii* herba esetében az etanol kloroformot fixáló hatása az etanolos kivonatnál látszott a legjobban, mert az első szakaszban lassította a migrációt, de miután a fixálás megszűnt, a folyamat annyira felgyorsult, hogy a frakcióknak nem volt idejük különválni, így emiatt elmosódtak. A kloroformos kivonatoknál is megtörtént a szétválás annak ellenére, hogy etanollal történt a kirázás. Az etilacetát:metil-etilketon:hangyasav: víz (5:3:1:1) futató elegy esetében az etanolos és kloroformos kivonatok közül az etanolos bizonyult jobbnak, mivel elválasztáskor több, 6 frakció különült el. Ez a frakciószám kevesebb volt, mint a Hevesi Tóth és munkatársai [5] által LC-MS/MS módszerrel azonosított polifenol komponensek száma.

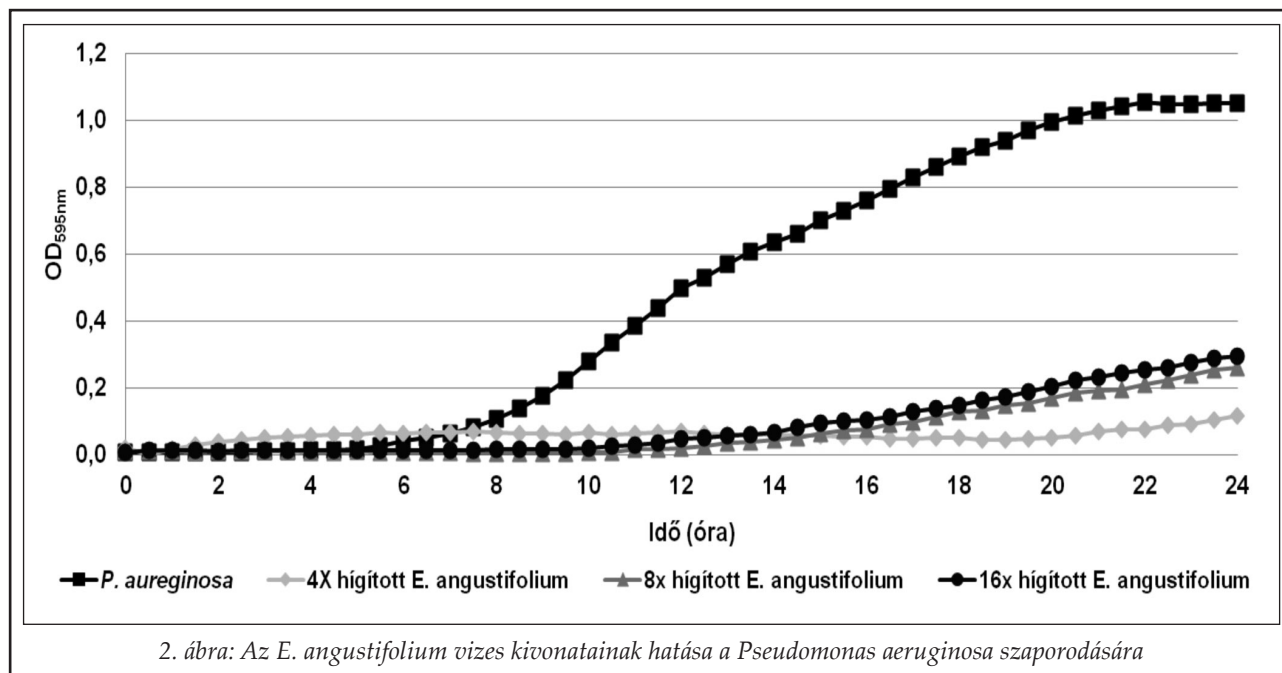
4. A cserzőanyagok mennyiségi meghatározása

A két vizsgált *Epilobium* faj cserzőanyag tartalma csak kismértékben tért el egymástól. Az *E. angustifoliae* herba cserzőanyag tartalma $0,497\% \pm 0,095$, míg az *E. parviflorii* herba-é $0,332\% \pm 0,057$ volt (a X. Román Gyógyszerkönyv szerinti számítás). A kapott értékek – összehasonlítva a cserzőanyagokban gazdag növényi részekkel – kicsinek bizonyultak.

5. Az *E. angustifolium* antimikrobás hatásának vizsgálata

A lyukdiffúziós módszerrel kapott antimikrobás eredmények alapján a koncentrált etanolos kivonatok bizonyultak a leghatásosabbnak, míg a hígított etanolos, valamint a vizes kivonatok kisebb mértékben, de jól látható zónákkal szintén gátoltak. A teljes feltisztulási zónák alapján a *Pseudomonas aeruginosa*, míg a részlegesen feltisztult zónák szerint a *Candida albicans* bizonyult érzékenyebbnek, a *Bacillus cereus* és a *Staphylococcus aureus* esetében hatás alig volt kimutatható.

A mikrotenyészetek szaporodásának vizsgálati eredményei alapján elmondható, hogy mind a koncentrált (0,062 g/ml), mind pedig a felező hígítású (0,031 g/ml) vizes kivonatok valamennyi vizsgált baktérium törzs szaporodását közel azonos mértékben gátolták. A kivonat négyszeres hígításban (0,016 g/ml) a *Pseudomonas aeruginosa* szaporodását gátolta a legnagyobb mértékben, ami a lag fázisnak kb. 15 órával való megnyújtásában mutatkozott meg, míg a *Bacillus cereus* és a *Staphylococcus aureus* esetében a lag fázis csak kb. 2

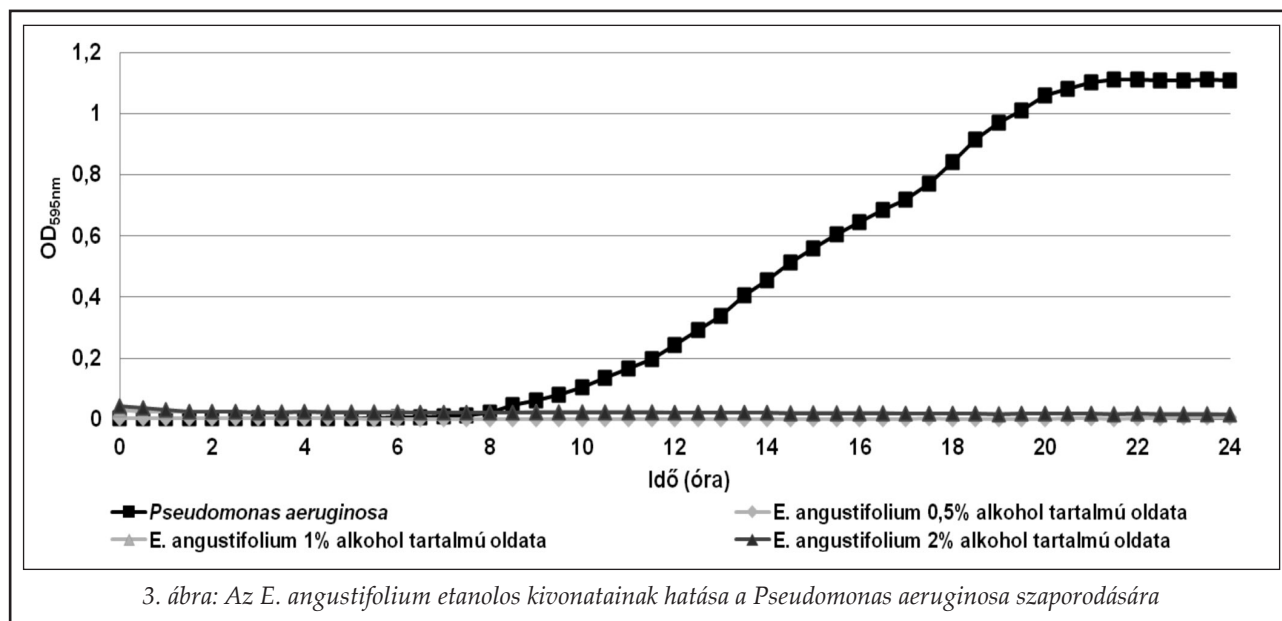


órával nőtt meg a kivonat nélküli kontroll tenyészetéhez képest. A vizes kivonat további hígításai már csak a *Pseudomonas aeruginosa*-ra voltak hatásosak úgy, hogy a 8-szoros hígítás a lag fázist kb. 7, míg a 16-szoros hígítás kb. 4 órával meghosszabbította, valamint a 24 órás inkubálási idő végére a sejtkoncentráció mindkét esetben kb. 70%-kal lecsökkent a kivonat nélküli kontrollhoz képest (2. ábra).

Az alkoholos kivonat hatásvizsgálatát megelőzően megvizsgáltuk a növényi kivonat 25-szörös hígítása után kapott 2%-os etanolnak a vizsgált mikrobaakra kifejtett hatását. Erre az etanol kon-

centrációra egyedül a *Pseudomonas aeruginosa* volt érzékeny, míg a másik három mikroba szaporodását a 2% alkoholos oldat nem befolyásolta.

Az etanolos növényi kivonat különböző koncentrációban mért gátlási eredményei azt mutatják, hogy a *Bacillus cereus* esetében a 2%-os kivonat teljes, míg az 1%-os részleges gátlást mutatott, mivel utóbbi csak a lag szakaszt hosszabbította meg 6 órával, de a sejtkoncentrációt nem befolyásolta. A *Staphylococcus aureus* szaporodását a 2%-os kivonat is csak részlegesen gátolta, ami a lag periódusnak 5 – 8 órával való megnyújtásában mutatkozott meg. A *Pseudomonas aeruginosa* volt a legin-



kább érzékeny a növényi kivonattal szemben, még a legkisebb koncentráció (0,5%) is hatásosnak bizonyult, mivel a 24 órás inkubálási idő alatt a sejtek szaporodása még meg sem kezdődött (3. ábra). Battinelli és munkatársai [16] több vizsgált *Epilobium* faj közül eredményeinkhez hasonlóan az *E. angustifolium* etanolos kivonatát találták a leghatékonyabbnak a *Staphylococcus aureus* és a *Pseudomonas aeruginosa* ellen, a *Bacillus cereus* elleni gátlóhatást azonban nem vizsgálták.

Következtetések

A kapott eredmények megerősítik, hogy az *E. parviflorum* növényi szterolokban gazdagabb, mint az *E. angustifolium* és feltehetően emiatt sikeresebben használható a jóindulatú prosztatata megbetegedések kezelésére, az *E. angustifolium* nagyobb flavonoid tartalma viszont előnyösebb a gyulladáscsökkentés szempontjából. Kimutattuk, hogy az *E. angustifolium*-nak nemcsak az etanolos, hanem a vizes kivonata is különböző mértékben gátlja egyes patogén mikroorganizmusok szaporodását, ami alapul szolgálhat külsőleg alkalmazandó fitoterápiás vagy fertőtlenítő hatású készítmények kifejlesztésére.

IRODALOM

1. List P.H., Hörhammer L.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, Springer-Verlag, Berlin, 1973, 787. old.
2. Oroian S.: Botanică farmaceutică, Editura Universității de Medicină și Farmacie, Marosvásárhely, 2011, 451–452. old.
3. Hevesi Tóth B.: *Epilobium* fajok potenciális hatóanyagainak fitokémiai és in vitro biológiai értékelése, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2009, 10–100. old.
4. Hevesi Tóth B., Kéry Á.: Acta Pharm Hung 79(1), 3–9 (2009).
5. Hevesi Tóth B., Blazics B., Kéry Á.: J Pharm Biomed Anal, 49, 26–31 (2009).
6. ***Farmacopeea Română, Ediția a X-a, Editura Medicală, București, 1993, 1043 – 1046, 1063–1065, 1053–1057. old.
7. Péter H.M.: Îndreptar de lucrări practice de farmacognozie, vol.I, Litografia I.M.F., Marosvásárhely, 1984, 144–145. old.
8. Ferenc L.: Biokémiai Gyakorlatok, Editura Sapientia EMTE, Marosvásárhely, 2009, 17–19. old.
9. <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/tlc/index.htm>
10. Szőke É., Kéry Á., Lemberkovics É.: Farmakognózia, növényi drogok farmakobotanikai és fitokémiai vizsgálata, Semmelweis kiadó, Budapest, 2009, 146. old.
11. Laczkó-Zöld E., Eșianu S., Csédő C.: Lipophilic substance from fruits of *Physalis alkekengi* L., Proceedings of the 4th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of South- East European Countries, Iași, Editura Alma Mater, Bacău, 446–449 (2006)
12. Sagdic O., Aksoy A., Ozkan G.: Acta Alimentaria, 35(4), 487–492 (2006).
13. Ambrus J.: Analiza fitochimică a conținutului în principii active a plantei *Melampyrum bihariense* KERN., Államvizsga dolgozat, Marosvásárhely, 2009, 34–35. old.
14. Szőke É., Kéry Á.: Farmakognózia gyakorlati jegyzet, Semmelweis kiadó, Budapest, 2000, 83. old.
15. ***MAGYAR GYÓGYSZERKÖNYV, VIII kiadás I. kötet, Medicina Könyvkiadó RT, Budapest, 2003, 232. old.
16. Battinelli L., Tita B., Grazia Evandri M., Mazzanti G.: II Farmaco 56, 345–348 (2001).

Érkezett: 2014. július 18.

R(+)*limonén* hatása a β -adrenerg jelátvitelre a simaizomzatban: az oxidatív stressz index jelentősége

HÓDI ÁGNES¹, FÖLDESI IMRE², HAJAGOS-TÓTH JUDIT¹, DUCZA ESZTER¹,
GÁSPÁR RÓBERT^{1*}

¹Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet, Szeged, Eötvös utca 6. – 6720

²Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Laboratóriumi Medicina Intézet, Semmelweis utca 6. – 6725

Levelezési cím: gaspar@pharm.u-szeged.hu

Summary

Hódi, A., Földesi, I., Hajagos-Tóth, J., Ducza, E., Gáspár, R.: *The effect of R(+)*limonene* on β -adrenergic signaling: the significance of oxidative stress index*

Reactive oxygen intermediers (ROI) play a role in the signal transduction of beta-adrenergic receptors. We investigated whether an antioxidant (*limonene*) can reduce the beta-mimetic effect of terbutaline in beta-2-adrenergic receptor (β_2 -AR)-regulated smooth muscles.

Tissue samples were collected from nonpregnant (trachea) and 22-day-pregnant (myometrium and cervix) rats. Tissue contractility was investigated in an isolated organ bath. In separate groups of animals, the tracheal and uterine β_2 -AR activities were upregulated by 17-beta-estradiol valerate (E2) and progesterone (P4), respectively. The total oxidant (TOS) and total antioxidant status (TAS) were also measured. The oxidative stress index (OSI) was defined as the ratio of TOS and TAS.

Terbutaline (10^{-10} - 10^{-5} M) decreased the spontaneous contractions in the nontreated and the P4-pretreated myometria. The concentration-response curves for terbutaline in the presence of 10^{-13} M *limonene* were shifted to the left, but the maximum inhibitory effect was unchanged. Terbutaline (10^{-6} M) increased the cervical resistance both in the nontreated and in the P4-treated samples, while *limonene* reduced this action only in the P4-treated cervixes. Terbutaline (10^{-9} - 10^{-4} M) reduced the tracheal tones both in the nontreated and in the E2-treated tissues, while *limonene* reduced these effects. The OSI was highest in the trachea and lowest in the pregnant myometrium.

Limonene has various influence on terbutaline induced effects in certain tissues. Higher OSI value means, that the antioxidants have greater role in the beta-adrenergic signalmechanism. We assume that the significance of ROI in the signalling process of the β_2 -ARs are divergent in the various tissues. Our results suggest that the antiasthmatic effect of beta-mimetics may worsen during parallel *limonene* administration.

Key-words: ROI, antioxidant, *limonene*, beta-adrenergic receptor, oxidative stress index

Összefoglalás

A béta adrenerg jelátvitelben jelentős szerepet játszanak a reaktív oxigén intermedierek (ROI). Jelen kísérleteink célja megvizsgálni, hogyan változik a terbutalin simaizomra gyakorolt béta-mimetikus hatása, antioxidáns (*limonén*) jelenlétében.

A kísérleteket nem vemhes (trachea) illetve 22 napos vemhes (miometrium, cervix) Sprague-Dawley patkányokból származó szerveken végeztük in vitro. A miometrium és a cervix esetében in vivo progeszteron (P4), míg a trachea esetében in vivo 17 β -ösztradiol valerát (E2) kezeléssel béta-adrenerg jelátvitel fokozást eredményezve is végeztünk vizsgálatokat. Meghatároztuk a totál antioxidáns kapacitást (TAS), illetve a totál oxidáns kapacitást (TOS). Ezek alapján kiszámítottuk a szövetek oxidatív stressz indexét (OSI = TOS/TAS).

A terbutalin (10^{-10} - 10^{-5} M) a miometrium esetében mind a P4-kezelt illetve nem kezelt esetben csökkentette a spontán kontrakciókat. *Limonénnel* (10^{-13} M) történt előinkubációt követően a terbutalin (10^{-10} - 10^{-5} M) dózis-hatás görbe balra tolódott, ugyanakkor a maximális gátló hatás változatlan maradt. A cervix esetében a terbutalin (10^{-6} M) rezisztenciafokozó hatása *limonén* előkezelést követően nem változott, azonban a P4 kezelés okozta terbutalin hatás-növekedést jelentősen csökkentette. A bronchus simaizom tónus terbutalin (10^{-9} - 10^{-4} M) hatására csökkent, melyet a *limonén* előkezelés mérsékelte. E2 kezelést követően a *limonén* tovább csökkentette a terbutalin bronchus tónusra kifejtett hatását. Az OSI a trachea esetében volt a legmagasabb, míg a legalacsonyabb a vemhes miometriumban.

A *limonén* különböző mértékben befolyásolja a terbutalin által kiváltott hatást az egyes szövetekben. Minél magasabb egy szövet OSI értéke, annál nagyobb szerepet kapnak a béta-adrenerg jelátvitelben a szabadgyökök. Eredményeink alapján elmondható, hogy az egyidejű *limonén* kezelés csökkentheti az asztma terápia hatékonyságát.

Kulcsszavak: ROI, antioxidáns, *limonén*, β_2 -adrenerg receptor, oxidatív stressz index

Bevezetés

Az emlősök oxidatív anyagcseréje magában foglalja a molekuláris oxigén redukcióját, amely a mitokondriumokban folyik. Ha az oxigén nagy mennyiségben áll rendelkezésre, ez a magasan szabályozott rendszer biztosítja a folyamatos ATP termelést, ami többek között az izmok kontrakciójához is nélkülözhetetlen. Az energia-felszabadítás során az oxigén egy négy-elektronos redukción esik át. A folyamatot a citokróm oxidáz katalizálja. A teljes oxigén 2-4 %-a azonban egy elektron redukción esik át, szuperoxid gyököt hozva létre ezáltal. További egy elektron leadással a szuperoxidból ($O\bullet 2$) hidrogénperoxid (H_2O_2) keletkezik, amely „kiszökve” a redukciós láncból károsíthatja az egyes sejtalkotókat.

Az utóbbi két évtized kutatásai szerint a szabadgyökök keletkezésének esszenciális szerepe van a fiziológiás és patológias szignálfolyamatok részvételében és irányításában. Ennélfogva a reaktív oxigén intermedierek (ROI) jelenléte nem feltétlenül okai a betegségeknek, de következményei lehetnek, így ezek a reakciók markerként használhatóak [1]. A ROI olyan molekulák összessége, amelyek központi atomként oxigént tartalmaznak és nagy reaktivitásuk miatt könnyen szabadgyökké alakulnak, melyek a külső elektronhéjon egy párosítatlan elektront tartalmaznak, így károsítják az egészséges sejteket. Ennek kivédésére a szervezetben antioxidáns enzimekből és biológiai antioxidánsokból álló rendszer működik. Ennek értelmében enzimatis és nem enzimatis védekező rendszereket különböztünk meg.

Oxidatív stressz akkor fordul elő, ha a homeosztázis az oxidáns és antioxidáns rendszerek között megbomlik, és a redox állapot az oxidáció irányába tolódik el. Ha az oxidáns kapacitás nagyobb az antioxidáns kapacitásnál, a ROI egy része kiszabadul az antioxidáns rendszer hatása alól. Oxidatív stressz során az egyes szövetek és szervek biomolekulái károsodhatnak. Az oxidált termékek mennyisége jelzi az oxidációs és javító rendszerek között fennálló kapcsolatot [2].

Szívizmon kimutatták, hogy oxidatív stressz során β -receptor aktiváció történik, ami megemeli a ROI képződését, ezzel fokozódik a Ca^{2+} beáramlás, ami nagyobb kontrakciókat eredményez [3]. Mivel az antioxidánsok használata napjainkban rendkívül elterjedt, felmerül a kérdés, hogy az antioxidáns hatás képes-e módosítani a béta-adrenerg gyógyszerhatásokat. E kér-

dések tisztázására célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a β -adrenerg agonista terbutalin simaizom relaxáló hatásának befolyásolhatóságát limonén jelenlétében. A limonén a terpének közé tartozó szerves vegyület. Királis molekula így két optikai izomere van, a D-limonén és az L-limonén. A (+)-limonén (D-limonén) a narancsolaj fő alkotórésze, ez az (*R*)-enantiomer [4]. A vegyületet főként a kozmetikai ipar használja, fontos összetevője a különféle illatszernek és parfümöknek. Erős antioxidáns hatása [5] mellett rendelkezik gyulladásgátló [6], antitumor [7], illetve anxiolitikus [8] tulajdonságokkal. Ezen hatásmechanizmusokról azonban keveset tudunk.

Kísérleteinkben *R*(+)-limonén jelenlétében vizsgáltuk a terbutalin patkány tracheára, miometriumra és cervixre kifejtett hatását izolált szervi rendszerben, valamint meghatározásra került a vizsgált szövetek oxidatív státusza.

Anyagok és módszerek

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági, Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (etikai engedélyszám: IV./198/2013).

Az állatok pároztatása

Ivarérett nőtény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. A pároztatás kezdetétől számított 4-5 órán belül a nőtény állatoktól hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt hímivar-sejteket kerestünk. Amennyiben a keresés pozitív eredménnyel zárult, akkor az állatot elkülönítettük, mint az 1. napos vemhes nőtényt.

Szövetek preparálása

A kísérleteket izolált szervi rendszeren végeztük *in vitro*, ehhez 22 napos vemhes, illetve ösztuszban lévő nőtény Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatok leölése után kivettük az állatok tracheáját, cervixét, illetve uterus gyűrűket metszettünk ki.

A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott puffert tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük. A cervix és az uterus gyűrűk esetében de Jongh oldatot használtunk (összetétele mM-ban:

137 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 12 NaHCO₃, 4 NaH₂PO₄, 6 glükóz, pH: 7,4), míg a trachea esetében Krebs puffert (összetétele mM-ban: 118 NaCl; 4.75 KCl; 2.5 CaCl₂; 1.19 K₂HPO₄; 25 NaHCO₃; 1.2 MgSO₄; 11 glükóz, pH: 7,4). Az adatok rögzítését és értékelését ISOSYS Data Acquisition System (Experimenta Kft., Magyarország) segítségével végeztük.

Western blot vizsgálatok

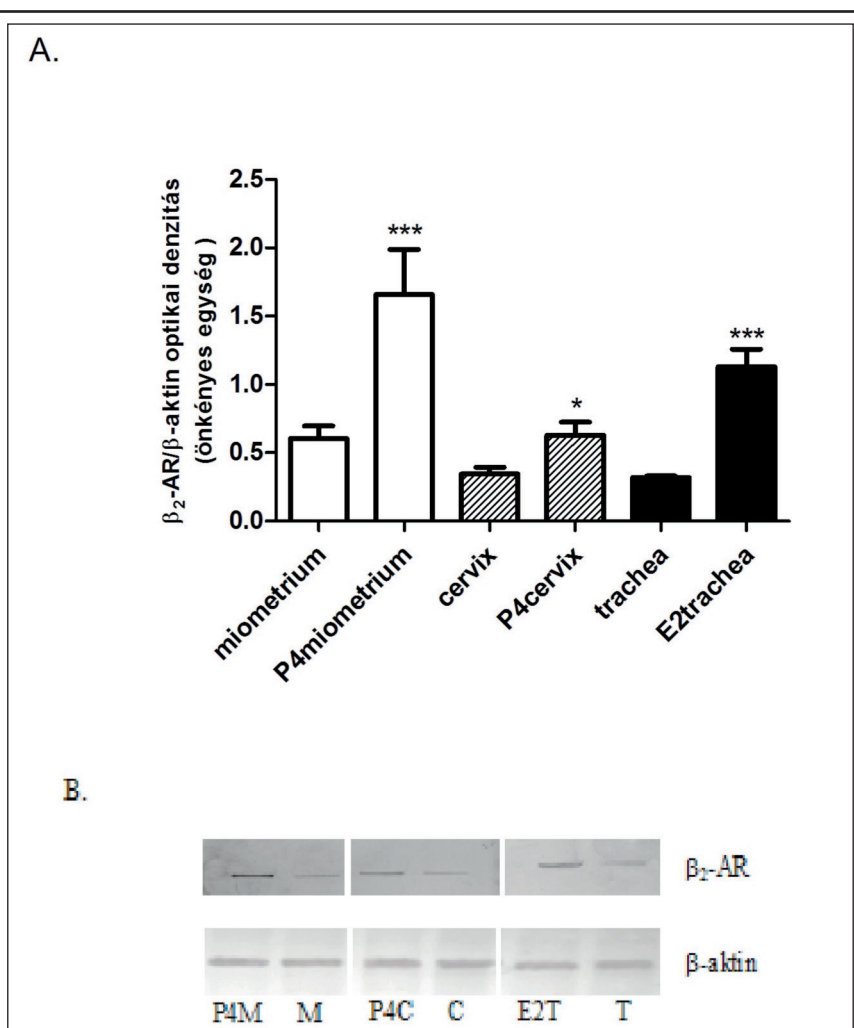
Mintánként 50 µg fehérjét 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris poliakrilamid gélen elektroforézisnek vetettünk alá. A fehérjét nitrocellulóz membránra helyeztük át, félszáraz blottoló eljárással (iBlot Gel Transfer System, Life Technologies, Magyarország). Mosás után a membránt szobahőmérsékleten β₂-adrenerg receptor és β-aktin poliklonális antitestekkel (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornia, 1:200), blokkoló pufferben 1 órán át inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat WesternBreeze Chromogenic Western blot immun-detektáló kit (Life Technologies, Magyarország) segítségével láthatóvá tettük, majd elektronikusan rögzítettük az EDAS290 Imaging System segítségével. Az optikai densitás meghatározása Kodak 1D Images szoftverrel történt. Az optikai densitást háttér kivonás után önkényes egységben határoztuk meg.

Terbutalin-limonén kombináció vizsgálata a miometrium kontrakciókra

Kísérleteinkben kumulatív módon terbutalin (10⁻¹⁰ – 10⁻⁵ M) dózis-hatás görbéket vetünk fel önmagában, illetve limonén (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungary) (10⁻¹³ M) jelenlétében. A terbutalin gátló hatását a spontán kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet értékeltük a kontroll AUC-hez viszonyítva.

Limonén és terbutalin cervix-rezisztenciára kifejtett hatásának vizsgálata

A cervix rezisztencia mérésekor a szövet fokozatos nyújtásra adott relaxációs válaszát vizsgáltuk 10⁻⁶ M terbutalin adagolását követően. A cervixet lépcsőzetesen, 1-től 10 grammos feszítési értékig nyújtottuk. Minden egyes feszítési érték beállítását 5 perc relaxációs idő követett. Értékeléskor a kezdeti nyújtás függvényében ábrázoltuk az 5 perccel később mért tenziót. A pontokra regressziós egyenest illesztettünk. Az egyenesek meredeksége jellemzi a cervix rezisztenciáját, a nagyobb meredekség nagyobb rezisztenciát jelent [9]. A nyújtási teszt kezdete előtt a szövetek egyik csoportját 10⁻¹³ M limonén jelenlétében inkubáltuk, míg a másik csoporthoz nem adtunk limonént.

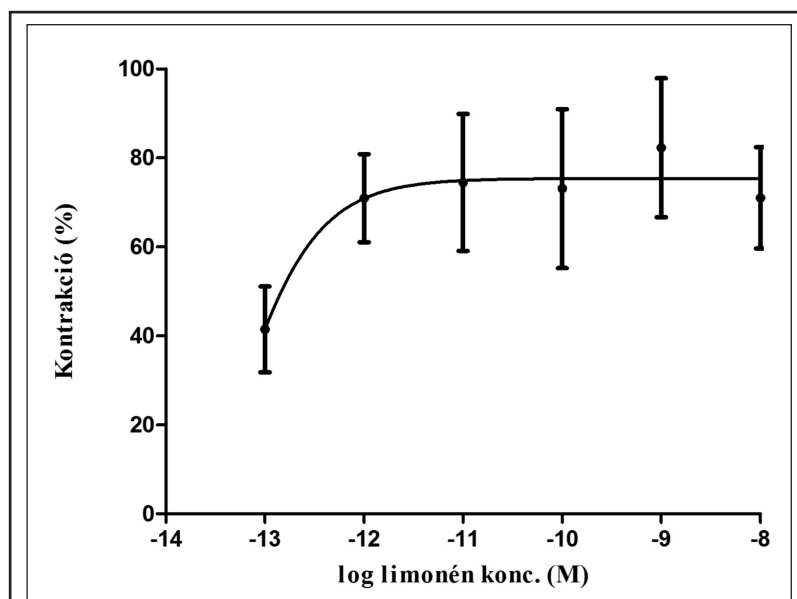


1. ábra: Hormonkezelés hatása a β₂ adrenerg receptor expresszió patkány miometriumon, cervixen és tracheán. (n=6) *: p<0,05, ***p<0.001

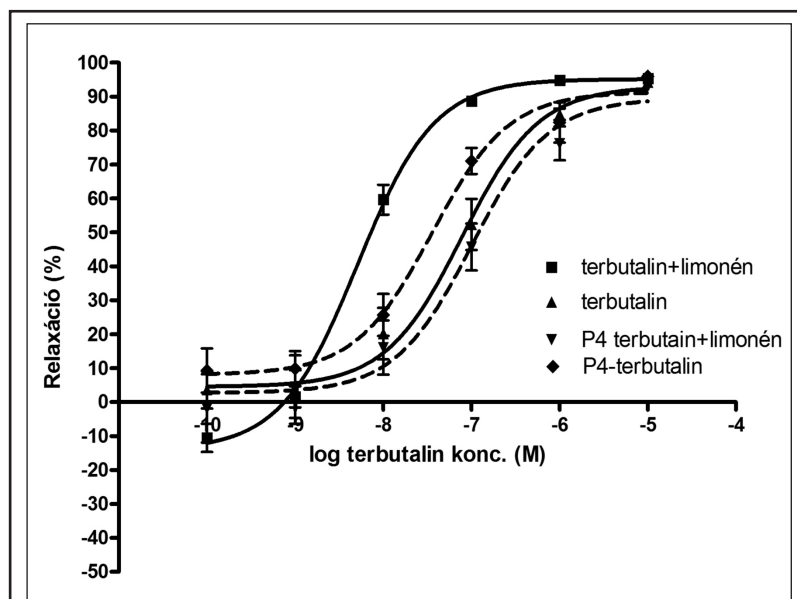
P4M: progeszteron kezelt miometrium, M: miometrium

P4C: progeszteron kezelt cervix, C: cervix

E2T: ösztrogén kezelt trachea, T: trachea



2. ábra: Az R(+)-limonén (10^{-13} – 10^{-8} M) 22 napos terhes miometrium kontrakcióra gyakorolt hatása, *in vitro*. (n=6)



3. ábra: A β_2 agonista terbutalin (10^{-10} – 10^{-5} M) relaxáló hatása spontán kontrakciókra 22 napos vemhes nem kezelt illetve, P4 kezelt (szaggatott vonal), patkány miometriumon 10^{-13} M limonén jelenlétében illetve önmagában. (n=6)

Limonén és terbutalin trachea tónusra kifejtett hatásának vizsgálata

A bronchus tónusának csökkenését mértük. Kumulatív módon terbutalin (10^{-9} – 10^{-4} M) dózis-hatás görbét vettünk fel önmagában, illetve 10^{-13} M limonén jelenlétében. A terbutalin gátló hatását az alap tónushoz viszonyítottuk és a csökkenés mértékét ábrázoltuk mg-ban. Minden egyes terbutalin dózist 5

perc relaxációs idő követett. Értékeléskor a kezdeti tónus függvényében ábrázoltuk a terbutalin hatását.

In vivo hormonkezelés

A progeszteront olívaolajban oldottuk és sc. injekció formájában adagoltuk 0,5mg/0.1ml-es dózisban. A kezelést a vemhesség 15. napjától a 21. napig folytattuk [10]. A 17β -ösztradiol valerátot szintén olívaolajban oldottuk és sc. injekció formájában adagoltuk. A kezelés 4 napon keresztül $1\mu\text{g}/200\text{g}$ dózisban történt [11].

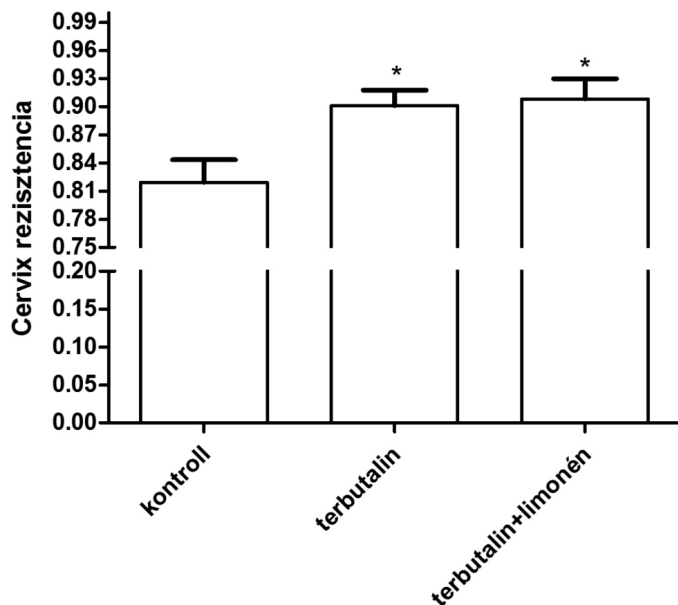
Az antioxidáns/oxidáns kapacitás mérése

A szöveti mintákat 10%-os (w/v) 20 mM Tris-HCl pufferben, 4 °C-on, IKA Ultra-Turrax T-25 Digital Homogenizátorral (Janke & Kunkel, Staufen, Németország) összedaráltuk. A homogenizátumot 5000 g fordulaton 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk le. A biokémiai vizsgálathoz a felülúszót használtuk [12].

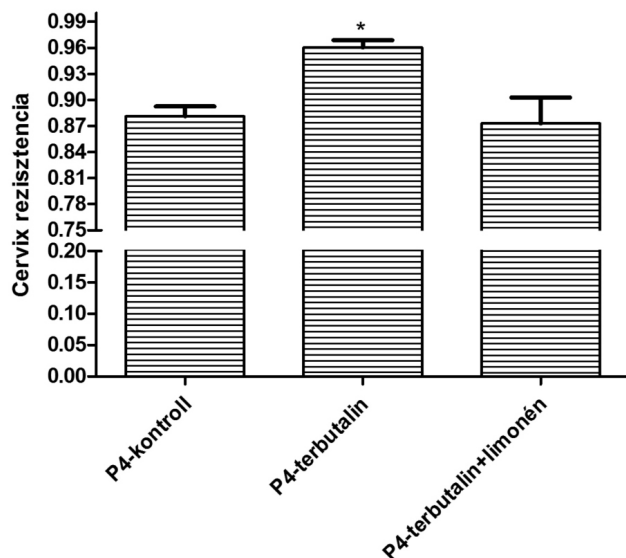
A totál oxidáns státusz (TOS) mérést immunoassay kit (RelAssay Diagnostics, Gaziantep, Törökország) segítségével végeztük. A mintában jelenlevő szabadgyökök a vas-*o*-dianizidin komplexet vas ionná oxidálja. Glicerinnel fokoztuk az oxidációs mechanizmust, amit a médium bőségesen tartalmaz. A Fe^{2+} savanyú közegben xylénol narancssal színes komplexet alkot. A színintenzitás spektrofotometriásan mérhető, ami arányos a mintában lévő oxidáns vegyületek mennyiségével. Az eredményt $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L-ben fejeztük ki [13].

A totál antioxidáns státusz (TAS) mérést szintén immunoassay kittel végeztük (RelAssay Diagnostics, Gaziantep, Törökország). A kimutatási reakció az ABTS oxidációján alapszik. H_2O_2 és metmioglobin jelenlétében a sötétzöld színű ABTS kation gyök keletkezik. Ha a mintában antioxidánsok vannak jelen, akkor a szabadgyökökkel reagálva a színintenzitás csökken, a minta elszíntelenedik. A reakció spektrofotometriásan nyomon követhető [14].

A.



B.



4. ábra: A β_2 -agonista terbutalin hatása a cervix rezisztenciára 10^{-13} M limonén jelenlétében. Az A ábra a nem kezelt, a B ábra a P4 kezelt cervixeken kapott eredményeket mutatja. (n=6) *: $p < 0,05$

Az oxidatív stressz index (OSI) értékét a TOS és TAS értékek hányadosa adja, melynek képlete: OSI (önkéntes egység) = $\text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekvi./L}) / \text{TAS (mmol Trolox ekvi./L)}$ [14].

Statisztikai elemzés

Az adatokat Prism 4.0. számítógépes program segítségével értékeltük ki, az eredmények statisztikai értékelését párosítatlan t-tesztel és ANOVA Dunnett tesztel végeztük.

Eredmények

β_2 adrenerg receptor expresszió patkány simaizom szövetekben

A Western-blot analízis igazolta, hogy a β_2 adrenerg receptor kifejeződése nem egységes a különböző simaizom szövetekben. A vemhes miometriumban a P4-kezelés hatására a β_2 receptor kifejeződés háromszorosára emelkedett, míg a cervix esetében megduplázódott. A tracheában az E2-kezelés négyszeres értékre emelte a receptorok számát (1. ábra).

Izolált szervi kísérletek eredményei

Miometrium

Izolált szervben a R(+)-limonén (10^{-13} – 10^{-8} M) dózisfüggően fokozta a spontán méh kontrakciókat (2. ábra). Kísérleteink során 10^{-13} M koncentrációban alkalmaztuk a R(+)-limonént ahol a kontrakció fokozás még nem volt jelentős mértékű (40%).

Izolált szervi rendszeren a terbutalin (10^{-10} – 10^{-5} M) dózisfüggően gátolta a spontán méh kontrakciókat. A terbu-

I. táblázat

A terbutalin vemhes miometrium kontrakciót gátló koncentráció-hatás görbéinek paraméterei limonén jelenlétében nem kezelt (a) és progeszteron kezelt (b) patkányokban *in vitro*

a)

Nem kezelt miometrium	EC ₅₀ (M±S.E.M)	E _{max} (M±S.E.M.)
terbutalin	1,4×10 ⁻⁷ ±3,7×10 ⁻⁸	93,7% ± 4,8
limonén+terbutalin	6,5×10 ⁻⁹ ±1,48×10 ^{-9**}	95,4% ± 1,6 ^{ns}

b)

P4 kezelt miometrium	EC ₅₀ (M±S.E.M)	E _{max} (M±S.E.M.)
terbutalin	8,6 × 10 ⁻⁸ ±3,35×10 ⁻⁸	88,5% ± 3,7
limonén+terbutalin	4,9 × 10 ⁻⁷ ±2,56×10 ^{-7 ns}	89,5% ± 6,3 ^{ns}

Jelmagyarázat:

EC₅₀: a maximális relaxáló hatás 50%-hoz szükséges terbutalin koncentráció

M: mol

S.E.M: standard error of mean

E_{max}: a terbutalin maximális gátló hatása

ns: nem szignifikáns

**: p<0,01

P4: progeszteron

talín dózis hatás görbéje limonén jelenlétében szignifikánsan balra tolódott, ugyanakkor a maximális gátló hatás nem változott (I. táblázat). A P4-kezelés következtében a terbutalin relaxációt okozó hatása felerősödött. Ebben az esetben, a limonén nem módosította szignifikánsan a terbutalin dózis-hatás görbáját (3. ábra).

Cervix

Vizsgálataink során a 22. vemhességi napon a terbutalin (10⁻⁶ M) jelenlétében megnövekedett a cervikális ellenállás, mely hatást a limonén nem befolyásolta (4A. ábra). A P4-kezelés hatására bekövetkezett β₂-receptor stimuláció miatt a terbutalin hatása fokozódott. Ebben az esetben a terbutalin cervix rezisztencia fokozó hatását ki-

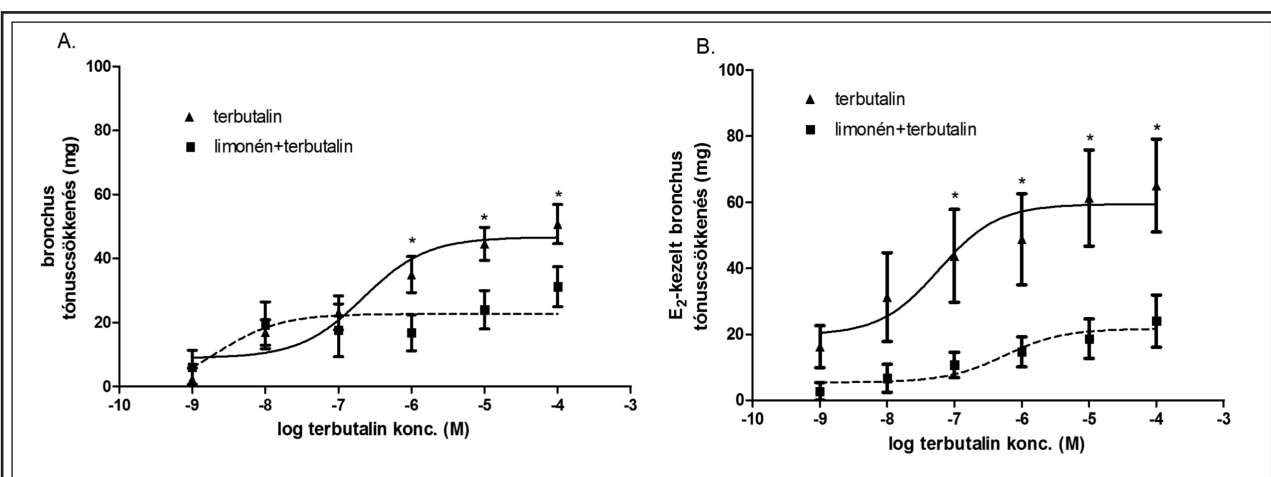
védte a 10⁻¹³ M dózisban adott limonén (4B. ábra).

Trachea

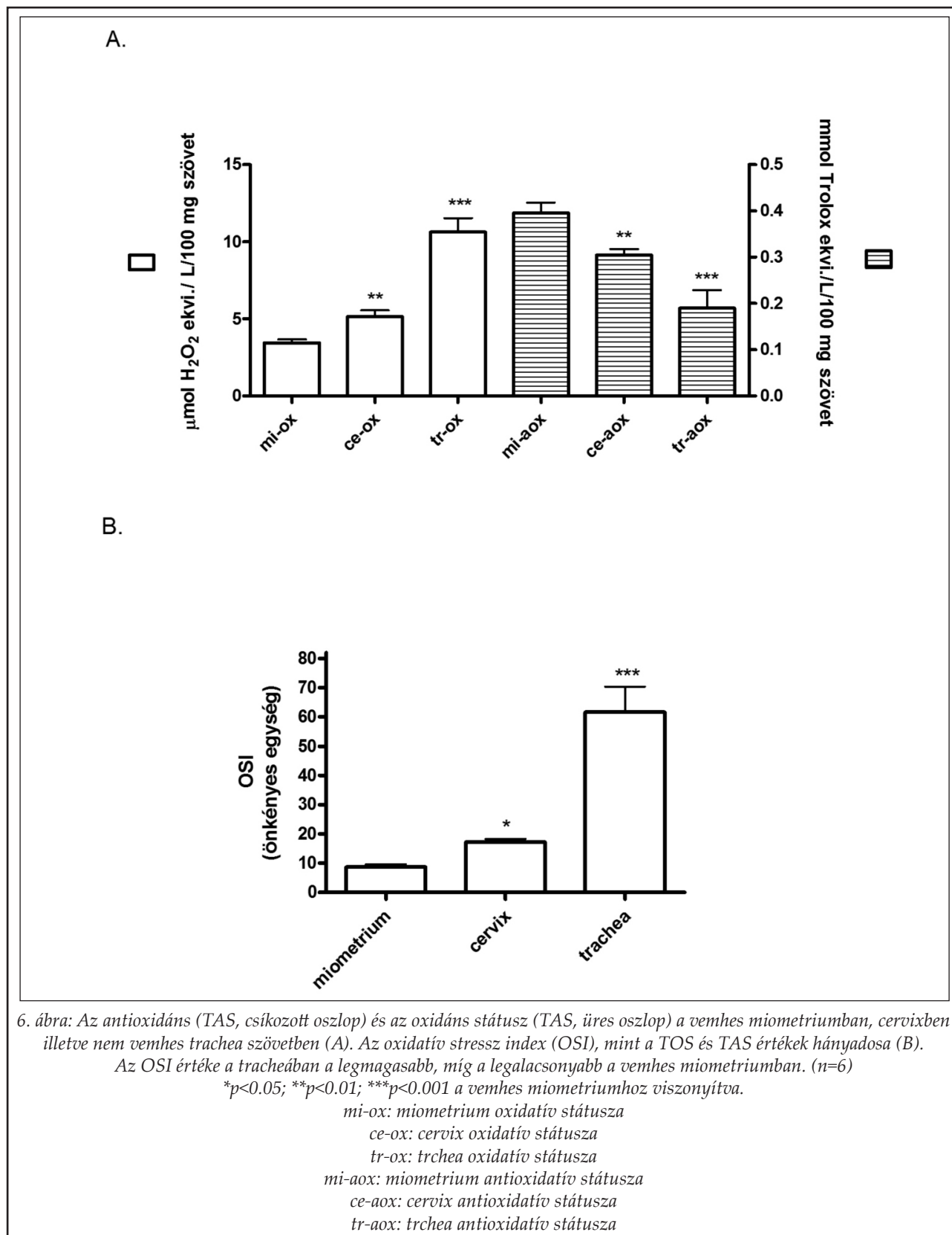
Izolált szerven a terbutalin (10⁻⁹–10⁻⁴ M) dózisfüggően csökkentette a trachea tónusát. Limonénnel történt előinkubációt követően a terbutalin bronchus relaxáló hatása csökkent (5A. ábra). E2-kezelést követően a terbutalin tónuscsökkentő hatása markánsabbá vált, amit a limonén jelenléte kivédett (5B. ábra).

Az oxidáns és antioxidáns státusz a patkány simaizom szövetekben

A legalacsonyabb TOS érték a vemhes miometriumban, a legmagasabb pedig a tracheában volt



5. ábra: A terbutalin bronchus tónuscsökkentő hatása önmagában és limonén (10⁻¹³ M) jelenlétében nem kezelt (A), illetve E2-kezelt állaton (B). (n=6) *p<0,05; a kontrollhoz viszonyítva.



mérhető. A vemhes cervixben magasabb oxidatív státuszt állapítottunk meg, mint a vemhes miometriumban. Az antioxidáns státusz ennek

pontosan az ellenkezőjét mutatta. A legmagasabb értéket a vemhes miometriumban mértük, míg a legalacsonyabbat a tracheában (6A. ábra). A két

érték hányadosa (TOS/TAS), az oxidatív stressz index (OSI) ennek megfelelően a vemhes miometriumban a legalacsonyabb, a tracheában pedig a legmagasabb (6B. ábra).

Az eredmények értékelése, következtetések

Az utóbbi időben nagy népszerűségnek örvend a különböző multivitamin készítmények és antioxidánsok napi rendszerességgel való fogyasztása, ami a hétköznapi ember számára ártalmatlannak tűnhet. Azonban túlzott fogyasztásuk hosszútávon nem biztos, hogy a kívánt hatást eredményezi [15].

Az elmúlt két évtized kutatásai rávilágítottak arra, hogy a ROI fontos szignálrendszer az intra- és intercelluláris kommunikációs folyamatokban és a redox-homeosztázis fenntartásában. Ellentmondásosnak tűnhet, hogy az emberi szervezetben egy komplex és nagyon effektív rendszer alakult ki a gyökök káros hatásai ellen, azonban a ROI által szabályozott folyamatok éppúgy védik a sejteket az oxidatív stressztől, helyreállítva annak redox-homeosztázisát. A szabadgyökök által indukált és szabályozott válasz képes befolyásolni a gén expressziót, az apoptózist, a sejt növekedést, a sejt adhéziót, a kemotaxist, a protein-protein interakciókat és enzimatis funkciókat, az angiogenezist, immunfolyamatokat, a gyulladásos folyamatokat, a Ca^{2+} homeosztázist, az ion csatornákat és számos egyéb folyamatot [16].

Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy szívizomban oxidatív stressz hatására erősebb kontrakciók figyelhetők meg, amely hatás a β -receptoron mediálódik [3]. Ezek alapján feltételezzük, hogy a béta-mimetikus jelátvitel közvetítésében fontos szerepet játszanak a szabadgyökök. Mivel a β_2 -receptor agonista vegyületeket alkalmazása a koraszülés megelőzésében illetve az asztma kezelésében széles körben elterjedt, ezért megvizsgáltuk, hogy az antioxidáns limonén hogyan hat a különböző simaizomszövetekre. A β_2 -AR agonista, terbutalin hatására a miometrium relaxál, a cervix-rezisztencia fokozódik, a trachea tónusa pedig csökken [5; 17, 18]. Limonén jelenlétében a terbutalin ezen hatásai különböző módon változtak. A monoterpénekről korábban leírták, hogy az L típusú Ca^{2+} -csatorna gátlásán keresztül relaxációt idéznek elő patkány mezenterialis artérián [19], illetve nyúl bélén [20]. Feltehetőleg a limonén a Ca^{2+} -csatorna gátlás következtében fokozza a terbutalin által kiváltott relaxációt a vemhes miometriumban. Azonban a cervix-rezisztenciára

kifejtett terbutalin hatás változatlan maradt, így ezen szövettípusban a limonén eredményeink alapján nem befolyásolja a simaizom működését. A trachea esetében a tónuscsökkenésből következően a hatásra, mivel ez a szövettípus nem kontrahál jelentős mértékben. A terbutalin koncentrációfüggően gátolta a trachea tónusát, amit a limonén jelenléte mérsékelte. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a miometriumon és a cervixen a tokoferol nem módosította a jelátvitelt, azonban a trachea tónusának csökkenését megakadályozta [21]. Az eltérő simaizom szöveti reakciók alapján felmerült a lehetősége annak, hogy a különbözőségek hátterében az egyes szövetek más-más ROI tartalma állhat.

Korábbi tanulmányokból tudjuk, hogy a szexuálhormonok szerepet játszanak a G protein kapcsolt β -adrenerg jelátvitelben. Mivel az adrenerg rendszer a terhes uterusban a szteroid hormonok szabályozása alatt áll gesztagén szubsztitúció szignifikánsan megnöveli a β agonista érzékenységet, azaz fokozza a G-protein kapcsolttságot. Tehát P4 kezeléssel a miometriumban és a cervixben érhető el β -receptor expresszió fokozódás [22], míg a trachea esetében ez E2 kezeléssel váltható ki [23]. Ha a jelátviteli mechanizmust fokozzuk, akkor valószínűsíthető, hogy ezzel párhuzamosan a ROI termelés is megemelkedik. A szignálmechanizmus hormonális fokozása következtében a terbutalin hatása a miometrium kontrakciókra kifejezettebb lett, azonban ezt a limonén nem befolyásolta szignifikánsan. A cervix esetében a rezisztenciafokozó hatást visszaszorította a kontroll értékre. A terbutalin tracheatónus csökkentő hatása limonén jelenlétében visszaesett. Ezek alapján feltételezhető, hogy a különböző simaizomszövetek eltérő mértékben termelnek szabadgyököt, illetve az antioxidáns védelem kapacitása is eltérhet.

A szövetekben képződött ROI és termékei szintjét az oxidatív státusszal jellemezzük, amit az oxidáns és antioxidáns kapacitás hányadosából számítunk ki [24]. Az antioxidáns kapacitás a vizsgált rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes gyökfogó hatását jelenti, míg az oxidáns kapacitás a szövetekben jelenlevő összes gyök oxidatív hatását. Méréseink alapján a legmagasabb OSI értékkel a trachea rendelkezik, míg a legalacsonyabbal a vemhes miometrium. A limonén hatása a β -jelátvitelre ott a legmarkánsabb, ahol az OSI értéke a legmagasabb. Ahol viszont az OSI érték alacsony, ott ez a hatás nem érvényesül. Mindezen eredmények alapján elmondhatjuk,

hogy a ROI szerepe a β_2 -adrenerg jelátvitel közvetítésében különböző mértékű a simaizomszövet funkciójától illetve lokalizációjától függően. A limonén esetében feltételezhető, hogy gyengíti az asztma kezelése során alkalmazott β_2 -agonista szerekre adott terápiás választ.

Köszönetnyilvánítás

Jelen cikk a TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 projekt keretében készült.

IRODALOM

1. Asmus K-D., and M. Bonifacic. 2000. Free radical chemistry. In: Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Sen C.K., L.Packer and O.P. Hänninen (eds.), Elsevier, Chapter 1. pp. 3-56.
2. Matsuo M. and T. Kaneko. 2000. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. In: Free Radicals in Exercise and Aging, Radák Zs. (ed.), Human Kinetics, Chapter 1. pp.1-34.
3. Andersson DC, Fauconnier J, Yamada T, Lacampagne A, Zhang SJ, Katz A, Westerblad H.: J Physiol 589, 1791-1801 (2011).
4. Lappas CM, Lappas NT.: Cell Immunol. 279(1), 30-41 (2012).
5. Grassmann J.: Vitam Horm. 72, 505-535 (2005).
6. Yoon WJ, Lee NH, Hyun CG.: J Oleo Sci. 59(8), 415-21 (2010).
7. Fábio V Andresen, Hugo Falzirolli, Sabrina A. Almeida Batista, Ana Paula B. da Silva-Giardina, Diogo N. de Oliveira, Rodrigo R. Catharinob, Ana Lúcia T.G. Ruiz, João E.de Carvalho, Mary Ann Foglioc, Cleuza Conceição da Silva Novel: European J. of Med. Chem 79, 110-116 (2014).
8. Lima NG, De Sousa DP, Pimenta FC, Alves MF, De Souza FS, Macedo RO, et al.: Pharmacol Biochem Behav. 103(3), 450-454 (2013).
9. Gáspár R, Kolarovszki-Sipiczki Z, Ducza E, Páldy E, Benyhe S, Borsodi A, Falkay G.: Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 371(1), 61-71 (2005).
10. Gáspár R, Ducza E, Mihályi A, Márki A, Kolarovszki-Sipiczki Z, Páldy E, Benyhe S, Borsodi A, Földesi I, Falkay G.: Reproduction 130(1), 113-122 (2005).
11. Song, Y.S., Jin, C., Jung, K.J. and Park, E.H.: J Ethnopharmacol 82, 89-95 (2002).
12. Unal E, Eris C, Kaya B, Uzun H, Cavdar F, Yildar M, Kiziler AR, Aydemir B, Gunes P, Kutanis R, Titiz I.: Gastroenterol Res Pract. 979506 (2012).
13. Erel O.: Clin Biochem 38(12), 1103-1111 (2005).
14. Erel O.: Clin Biochem 37(4), 277-285 (2004).
15. Huang HY, Caballero B, Chang S, Alberg AJ, Semba RD, Schneyer CR, Wilson RF, Cheng TY, Vassy J, Prokopowicz G, Barnes GJ, Bass EB.: Ann Intern Med. 145(5), 372-385 (2006).
16. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telsler J.: Int J Biochem Cell Biol 39, 44-84 (2007).
17. Gáspár R, Gál A, Gálík M, Ducza E, Minorics R, Kolarovszki-Sipiczki Z, Klukovits A, Falkay G.: Neurochem Int. 51(5), 311-318 (2007).
18. Chou YL, Wu CC, Wang HW.: Eur Arch Otorhinolaryngol. 267(8), 1305-1311 (2010).
19. Silva DF, Araújo IG, Albuquerque JG, Porto DL, Dias KL, Cavalcante KV, et al.: Basic Clin Pharmacol Toxicol. 109(6), 465-475 (2011).
20. Devi RC, Sim SM, Ismail R.: J Smooth Muscle Res. 47(5), 143-156 (2011).
21. Hódi A, Földesi I, Ducza E, Hajagos-Tóth J, Seres AB, Klukovits A, Gáspár R.: Life Sci. 105(1-2), 48-55 (2014).
22. Elwardy Merezak, J.; Maltier, J. P.; Cohen Tannoudji, J.; Lecrivain, J. L.; Vivat, V.; Legrand, C.: Journal Of Molecular Endocrinology 13(1), 23-37 (1994).
23. Townsend EA., Thompson MA, Pabelick CM., Prakash YS.: Am J Physiol 298, 521-530 (2010).
24. Bozkus F., San I., Ulas T., Iymen I., Yesilova Y., Guler Y., Aksoy N.: Acta otorhinolaryngologica italica 33, 248-253 (2013).

Érkezett: 2014. július 18.

Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

Közlésre elfogadunk:

1. *Összefoglaló közleményeket*, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. *Közleményeket*, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. *Rövid közleményeket*, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Felelősen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

A kézirat elkészítésének módja:

a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rác L., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31–68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdey-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szeretlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadóak.

b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A *dolgozat címe* (esetleg alcíme).

A *szerző(k) teljes neve* (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) *munkahelye* teljes postai címmel, valamint a *levelező szerző e-mail címe*.

A *dolgozat magyar nyelvű összefoglalása*.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcsszavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat *címe angol nyelven*, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

Irodalomjegyzék.

